UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE DERMATOLOGÍA, ESTOMATOLOGÍA, RADIOLOGÍA Y MEDICINA FÍSICA

Efectos de *Films* de Fibroína de seda/Óxido de Grafeno vs Fibroína de Seda/Óxido de Grafeno Reducido sobre Células Madre Humanas de Ligamento Periodontal

Dª María del Mar Vera Sánchez

2015

Efectos de *films* de fibroína de seda/óxido de grafeno vs fibroína de seda/óxido de grafeno reducido sobre células madre humanas de ligamento periodontal.

Memoria presentada por
María del Mar Vera Sánchez
para optar al Grado de
Doctora en Biología por la
Universidad de Murcia.

Directores:

Dr. Francisco Javier Rodríguez Lozano

Dr. Salvador D. Aznar Cervantes

Dr. Ricardo Oñate Sánchez

A mis seres queridos…

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento:

A mis directores de tesis,

Francisco Javier Rodríguez Lozano y Salvador David Aznar Cervantes, por brindarme la oportunidad de trabajar en esta estimulante línea de investigación, así como por su apoyo, asesoramiento, comprensión y facilidades para desarrollar este trabajo durante los últimos 3 años. Y a Ricardo Oñate Sánchez, por sus apreciadas aportaciones a esta tesis desde su dilatada experiencia.

A David García Bernal (Unidad de Terapia Celular y Trasplante Hematopoyético, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca) y Eva Jóver García (Departamento de Cardiología, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca), por su inestimable contribución al desarrollo de este trabajo, asesoramiento y actualización de nuevas técnicas en biología celular y molecular.

Al IMIDA, en la persona de José Luis Cenis Anadon, por poner a mi disposición los medios tanto materiales como humanos del equipo de biotecnología del gusano de seda al que dirige.

A todos los investigadores y técnicos del CEIB-LAIB, que me acogieron, ayudaron y guiaron en el laboratorio siempre que lo necesité de forma desinteresada. Sois una gran familia.

A mis queridos amigos, por ser la mejor herramienta para eliminar el estrés y aparcar los problemas y, sobre todo, por el tremendo amor que he recibido de ellos en los momentos en los que la enfermedad me golpeó sin piedad e interrumpió temporalmente el desarrollo de esta tesis. Sonia, Curro, Laura, Mari Cruz, gemelas… Y Fran, ¡qué te voy a decir a ti que no sepas ya de esta tesis!

A toda mi familia (mamá, papá, Fina y Paco), por su apoyo constante e incondiconal, ya sea cuidando a los niños o evitando que tenga que meterme en la cocina. El tiempo que me habéis “sustituido” ha sido fundamental para terminar este trabajo.

A Juan, por ser el pilar que sostiene mi vida.

Y también a mis tres enanos, porque, aunque difícilmente han contribuído al desarrollo de esta tesis, contemplarlos (¡cuando se portan bien!) me da otra perspectiva de la vida.

FINANCIACIÓN

Este trabajo ha sido financiado por la Red Española de Terapia Celular (TerCel) otorgada por el Instituto de Salud Carlos III (ISCiii) (RETICS RD07/0010/2012 y RD12/0019/0001) y el Programa Conjunto para la Investigación Biomédica en Terapias Avanzadas y Medicina Regenerativa del ISCiii y el FFIS (Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia).

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN…… **1**
1.1. BIOMATERIALES E INGENIERÍA DE TEJIDOS…….. 3
1.1.1. INGENIERÍA DE TEJIDOS EN ODONTOLOGÍA…….. 5
1.2. LA FIBROÍNA DE SEDA…… 7
1.2.1. NATURALEZA QUÍMICA DE LA FIBROÍNA DE SEDA……... 7
1.2.2. LA FIBROÍNA DE SEDA COMO BIOMATERIAL…….. 12
1.2.2.1. Propiedades de la fibroína de seda como biomaterial……... 13
A. Biocompatibilidad……..... 13
B. Propiedades mecánicas…… 14
C. Biodegradación…… 15
D. Funcionalización de la superficie…….. 17
1.2.2.2. Presentaciones de la fibroína como biomaterial…… 18
A. Mallas electrohiladas…….. 18
B. Hidrogeles…… 20
C. Esponjas porosas…… 21
D. Micro y nanopartículas…… 22
E. *Films* o películas transparentes……... *22*
1.2.2.3. Aplicación de la fibroína de seda en ingeniería de tejidos…… 23
A. Regeneración de tejido vascular…….. 24
B. Regeneración de tejido neural…….. 24
C. Regeneración de la piel…… 25
D. Regeneración de hueso…… 25
E. Regeneración de cartílago…… 27
F. Regeneración de ligamentos y tendones…… 27
G. Regeneración de tejido cardíaco…….. 27
H. Regeneración de tejido ocular…….. 28
I. Regeneración de tejido hepático…… 28
J. Regeneración de la médula espinal…….. 29
K. Regeneración de tejido intervertebral……... 29
L. Regeneración de la vejiga urinaria…… 29
M. Regeneración de tejido traqueal…… 30
N. Regeneración de la membrana timpánica…… 30
O. Regeneración de tejido dental…… 31
1.3. EL GRAFENO…….. 33
1.3.1. ÓXIDO DE GRAFENO……... 34

A. Estructura del óxido de grafeno…….. 35
B. Reducción del óxido de grafeno…….. 35
1.3.2. EL GRAFENO COMO BIOMATERIAL…….. 39
1.3.2.1. Propiedades del grafeno como biomaterial…….. 39
A. Biocompatibilidad……. 39
B. Propiedades mecánicas……. 41
C. Biodegradación……. 41
D. Funcionalización del grafeno……. 41
1.3.2.2. Presentaciones del grafeno como biomaterial……. 43
A. *Films*…….. 43
B. Espumas……... 44
C. Recubrimientos……. 44
1.3.2.3. Aplicaciones del grafeno en ingeniería de tejidos…… 45
1.4. CÉLULAS MADRE……. 49
1.4.1. DEFINCIÓN Y CLASIFICACIÓN……. 49
1.4.2. CÉLULAS MADRE DENTALES…….. 50
1.4.3. CÉLULAS MADRE DE LIGAMENTO PERIODONTAL…… 53

2. OBJETIVOS…… **57**

3. MATERIAL Y MÉTODOS…… **61**
3.1. CÉLULAS MADRE HUMANAS DE LIGAMENTO PERIODONTAL…… 63
3.1.1. AISLAMIENTO CELULAR……. 63
3.1.2. CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS DE LIGAMENTO PERIODONTAL…….. 64
3.1.3. RECUENTO Y ESTIMACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR…… 66
3.2. BIOMATERIALES……. 67
3.2.1. PROCESADO DE LA SEDA……. 67
3.2.2. ELABORACIÓN Y COMPOSICIÓN DE LOS BIOMATERIALES…… 67
3.3. ANÁLISIS TOPOGRÁFICO DE LOS *FILMS* Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS hPDLSCs POR MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)…… 71
3.4. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN MEDIANTE MTT……... 73
3.4.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO…… 74
3.5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE SUPERFICIE DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES POR CITOMETRÍA DE FLUJO…… 75
3.6. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR…….. 77
3.7. EXPRESIÓN GÉNICA…… 79

3.7.1. AISLAMIENTO DE RNA…… 79
3.7.2. SÍNTIESIS DE cDNA…… 80
3.7.3. PCR CUANTITATIVA Y GENES SELECCIONADOS…….. 81
3.7.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO…… 86

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN…… **87**
4.1. CULTIVO DE hPDLSCs…… 89
4.2. ANÁLISIS DE LA TOPOGRAFÍA DE LOS *FILMS* BASADOS EN GRAFENO Y FIBROÍNA…… 91
4.3. ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA DE hPDLSCs SOBRE DIFERENTES *FILMS* BASADOS EN GRAFENO Y FIBROÍNA…… 97
4.4. PROLIFERACIÓN DE hPDLSCs SOBRE DIFERENTES *FILMS* BASADOS EN GRAFENO Y FIBROÍNA…….. 101
4.4.1. *FILMS* OXIDADOS VS REDUCIDOS…… 103
4.4.2. SINERGISMO ENTRE BIOMATERIALES BASADOS EN GRAFENO Y FIBROÍNA…….. 104
4.5. CITOTOXICIDAD DE *FILMS* BASADOS EN GRAFENO Y FIBROÍNA SOBRE hPDLSCs…… 107
4.6. EXPRESIÓN DE MARCADORES DE SUPERFICIE DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES EN hPDLSCs CULTIVADAS SOBRE FILMS BASADOS EN GRAFENO Y FIBROÍNA…… 109
4.7. CO-EXPRESIÓN DE FACTORES FENOTÍPICOS CEMENTOBLÁSTICOS DURANTE LA DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA DE hPDLSCs……... 111
4.8. SOBRE-EXPRESIÓN DE GENES CEMENTOBLÁSTICOS EN hPDLSCs CULTIVADAS SOBRE *FILMS* BASADOS EN GRAFENO Y FIBROÍNA…….. 115

5. CONCLUSIONES…….. **123**

6. BIBLIOGRAFÍA…… **127**

7. ÍNDICE DE ABREVIATURAS…… **151**
8. ÍNDICE DE FIGURAS……... **153**
9. ÍNDICE DE TABLAS…… **157**

1. INTRODUCCIÓN

1.1. BIOMATERIALES E INGENIERÍA DE TEJIDOS

En 1988, durante una reunión de la *National Science Foundation*, se acuñó el término **ingeniería de tejidos** como *la aplicación de los principios y métodos de ingeniería y ciencias de la vida hacia el entendimiento fundamental de la relación estructura-función en tejidos de mamíferos tanto sanos como patológicos y el desarrollo de sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar la función tisular* (1). Este concepto se incluye en el marco de la *medicina regenerativa*, un área interdisciplinar emergente encargada de investigar y realizar aplicaciones clínicas orientadas a la reparación, reemplazo o regeneración de células, tejidos u órganos para restaurar una función dañada debida a defectos congénitos, enfermedad, trauma o envejecimiento. Las aproximaciones tecnológicas que alberga este campo incluyen el uso de moléculas solubles, terapia génica, terapia con células madre y el empleo de **biomateriales** que proporcionen un soporte (Fig.1)(2).

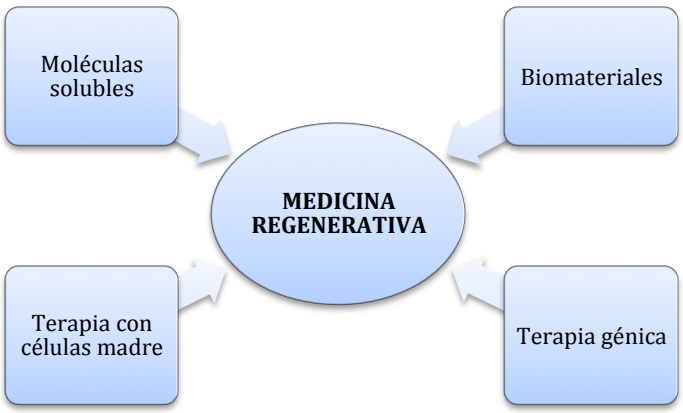

Figura 1. Áreas de investigación en medicina regenerativa (modificado de Dieckmann y col. (2)).

El primer biomaterial que se conoce con este término, fue desarrollado por Erdle y Prange en la década de 1920. Unieron sus conocimientos de médico dentista y metalurgia, respectivamente, para desarrollar el primer biomaterial metálico, la aleación Vitallium (3). Sin embargo, la definición de biomaterial ha sido difícil y laboriosa, no siendo hasta 1991, en la segunda conferencia de consenso sobre definiciones en el campo de biomateriales celebrada en Chester (Reino Unido), cuando se acordó que un biomaterial es *un material diseñado para actuar interfacialmente con sistemas biológicos con*

el fin de evaluar, tratar, mejorar o reemplazar algún tejido, órgano o función del cuerpo.

Una característica imprescindible de los biomateriales es que sean biológicamente aceptables o biocompatibles, es decir, no deben poseer actividad tóxica, mutágena, carcinógena o teratógena, ni activar una respuesta del sistema inmunitario (4). Durante los años 60 y 70, tuvo lugar la primera generación de biomateriales. En este período de tiempo, la meta era obtener materiales cuyas propiedades físicas se adaptaran lo mejor posible a las del tejido a reemplazar y que reaccionaran mínimamente con el tejido circundante. A partir de los años 80, surge una segunda generación de biomateriales con el fin de inducir una reacción controlada por parte del tejido vivo, es decir, materiales bioactivos como los vidrios bioactivos de silicio y la hidroxiapatita (**HA**). Durante esta segunda generación, también se originan los materiales bioabsorbibles, como los polímeros biodegradables principalmente, a los que se le atribuye una aplicación temporal. Recientemente ha surgido una tercera generación de biomateriales, que buscan interactuar con el tejido de forma específica, mediante estímulos a nivel celular y molecular, y combinan ser bioabsorbibles y bioactivos dentro del mismo material (5). La naturaleza de los biomateriales con los que fundamentalmente trabajan los investigadores dedicados a esa área son materiales cerámicos, poliméricos o materiales compuestos, aunque cada vez más se mira hacia los materiales presentes en la Naturaleza, para poderlos imitar en la fabricación de materiales sintéticos (6).

La ingeniería de tejidos, iniciada hace una década, está en pleno apogeo investigador y dando los primeros frutos de su desarrollo (7). Se trata de un área interdisciplinar fundamentada sobre el trinomio células, andamios (*scaffolds*) y factores de crecimiento (8). La posibilidad de conformar *scaffolds* fabricados con materiales de distinta naturaleza para utilizarlos como sustratos en ingeniería tisular, abre un prometedor futuro en el campo de los biomateriales. Sobre el sustrato se cultivan células para que la pieza llegue a colonizarse, lo que puede realizarse tanto *in vitro* como *in vivo* (1). Uno de los objetivos primordiales es el desarrollo de materiales para lograr la reparación funcional y la reconstrucción de estructuras biológicas. En este sentido se

está dedicando especial atención a la obtención y caracterización de superficies de diferentes sustratos, para su aplicación en el desarrollo de estructuras tridimensionales utilizables en ingeniería de tejidos. Uno de los aspectos prioritarios es el estudio y modificación de las propiedades superficiales de los sustratos, con el fin de modular su interacción con entidades biológicas tales como macromoléculas y células (9).

1.1.1. INGENIERÍA DE TEJIDOS EN ODONTOLOGÍA

En la práctica odontológica existe una necesidad creciente de protocolos terapéuticos capaces de regenerar tejidos susceptibles de sufrir pérdida de función debida a procesos inflamatorios o traumáticos. En este sentido, dentro de la medicina regenerativa, la ingeniería de tejidos aplicada a células madre es uno de los campos de mayor interés (10). Concretamente, las células madre mesenquimales adultas podrían representar, en un futuro cercano, un nuevo *gold standard* en la regeneración de todos los tejidos orales. La medicina regenerativa enfocada a la ingeniería y proliferación de células, tejidos y órganos autólogos *ex vivo* puede reducir significativamente los actuales problemas médicos de rechazo inmunológico (11). La revisión de Bossù y col. muestra cómo en los últimos años se ha observado un incremento exponencial de las publicaciones basadas en trabajos con células madre en odontología (10). Aunque todavía se sabe muy poco de cómo crear microambientes locales, o nichos artificiales, que dirijan el comportamiento y destino de las células madre (12), se han publicado diversos trabajo en los que se emplean las distintas células madre dentales de origen humano sobre *scaffodls* de diversa naturaleza (destaca el uso de HA), orientados a la diferenciación odonto-, osteo- y cementoblástica y aplicados en modelos animales fundamentalmente murinos (10).

En el caso de la regeneración de los tejidos periodontales, en los últimos 10-15 años, se han conseguido avances significativos en el desarrollo de biomateriales utilizados como *scaffolds* biodegradables. Con el concepto actual de ingeniería de tejidos, las terapias regenerativas contemplan la arquitectura

completa del tejido, dirigiendo su objetivo a la creación de *scaffolds* que creen una matriz 3D temporal para que las células y tejidos puedan crecer exclusivamente *in vitro* y/o *in vivo* (Fig. 2)(13). En este sentido, se han empleado las membranas GTR/GBR (*guided tissue/bone regeneration*) y otros polímeros sintéticos (politetrafluoroetileno, polilactidas y glicólidos) para tratar defectos periodontales y alveolares, así como para el mantenimiento de la integridad del hueso alveolar tras una extracción dentaria. Como alternativa a estos polímeros, se ha propuesto el colágeno como material biomimético, aplicándolo a la regeneración de tejidos, la inducción osteogénica o la inmovilización de nanopartículas de HA. En los últimos años se ha estudiado también el papel de diversos factores de crecimiento y citoquinas en la regeneración periodontal, obteniendo buenos resultados *in vitro* e *in vivo*, aunque contradictorios clínicamente, como una regeneración periodontal incompleta. En los defectos óseos y de cartílago, los resultados clínicos obtenidos empleando membranas GTR/GBR han sido mejores, pero han tenido que enfrentarse a las infecciones bacterianas como un problema frecuente. Los resultados publicados en el caso del empleo de nanotubos de carbono han demostrado un gran potencial de este biomaterial en la formación y la reparación/regeneración ósea.

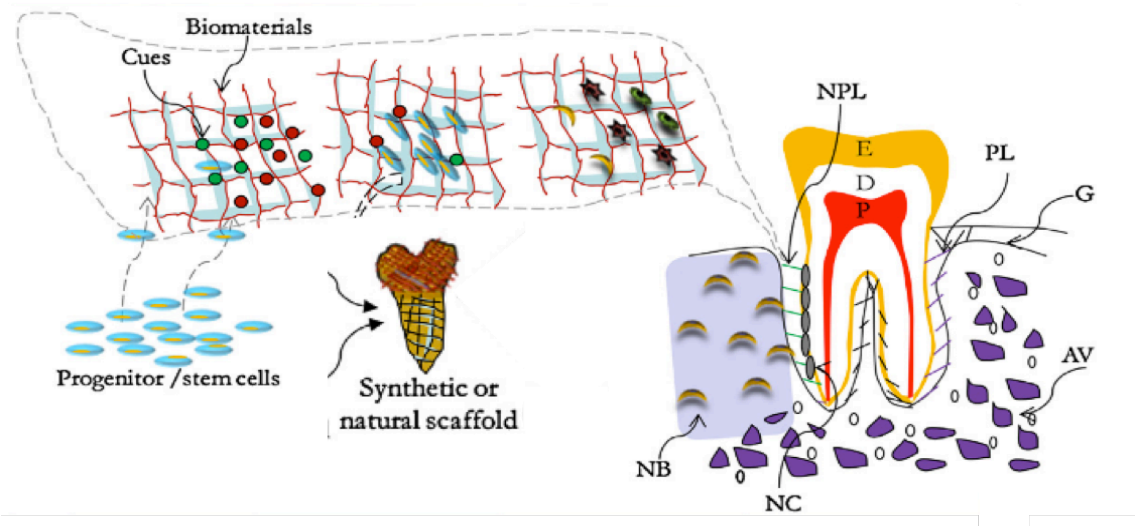

Figura 2. Representación esquemática de la obtención e implante de células especializadas de la cavidad oral, a partir de células madre cultivadas sobre biomateriales para la regeneración de tejidos periodontales (E: esmalte, D: dentina, P: pulpa, G: tejido gingival, PL: ligamento periodontal, AB: hueso alveolar, NPL: nuevo ligamento periodontal, NB: hueso nuevo, NC: cemento nuevo) (modificado de Neel 2014 (14)).

1.2. LA FIBROÍNA DE SEDA

La utilización de la seda como material de sutura en cirugía data de varios siglos. En este sentido, la seda tiene una amplia tradición como biomaterial en una aplicación muy delimitada. Sin embargo, el gran interés que ha despertado la seda como biomaterial ha surgido recientemente enmarcada en la ingeniería de tejidos (15).

De forma sorprendente, en torno a los primeros años de la pasada década, una serie de trabajos del grupo de D.L. Kaplan, de la Universidad Tufts, en Boston, pusieron de manifiesto que una proteína de la seda, la fibroína, reúne las cualidades necesarias para constituir un biomaterial muy adecuado para su uso en aplicaciones relacionadas con la ingeniería de tejidos. A partir de estos primeros trabajos, la atención dedicada a la fibroína de seda (**SF**, por sus siglas en inglés, *silk fibroin*) no ha dejado de crecer, desarrollándose continuamente nuevas aplicaciones (16–18).

1.2.1. NATURALEZA QUÍMICA DE LA FIBROÍNA DE SEDA

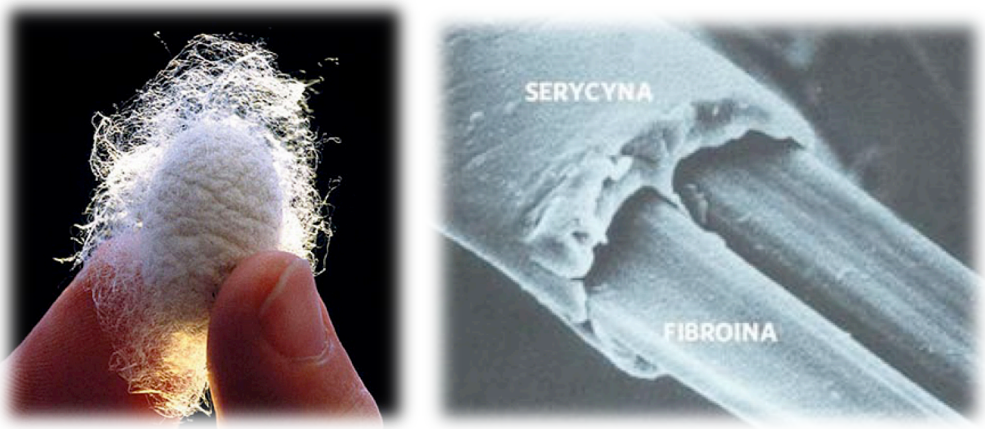

Figura 3. Capullo de *Bombix mori* (izquierda). Disposición de las proteínas fibroína y sericina en las fibras producidas por *B. Mori* (derecha).

Las proteínas de seda están presentes en las glándulas de artrópodos productores de seda (como los gusanos de seda, arañas, escorpiones, ácaros

y abejas) (15). Pueden desempeñar diversas funciones, desde construcciones de redes para la captura de presas, como es el caso de las arañas, hasta funciones de protección durante el proceso de metamorfosis, como ocurre con los capullos del gusano de seda (Fig.3) (19). Son dos, fibroína y sericina, las proteínas que componen las fibras producidas por el gusano de seda, *Bombix mori*, alcanzando un diámetro de entre 10 y 25 μm cuando se asocian (Fig.3).

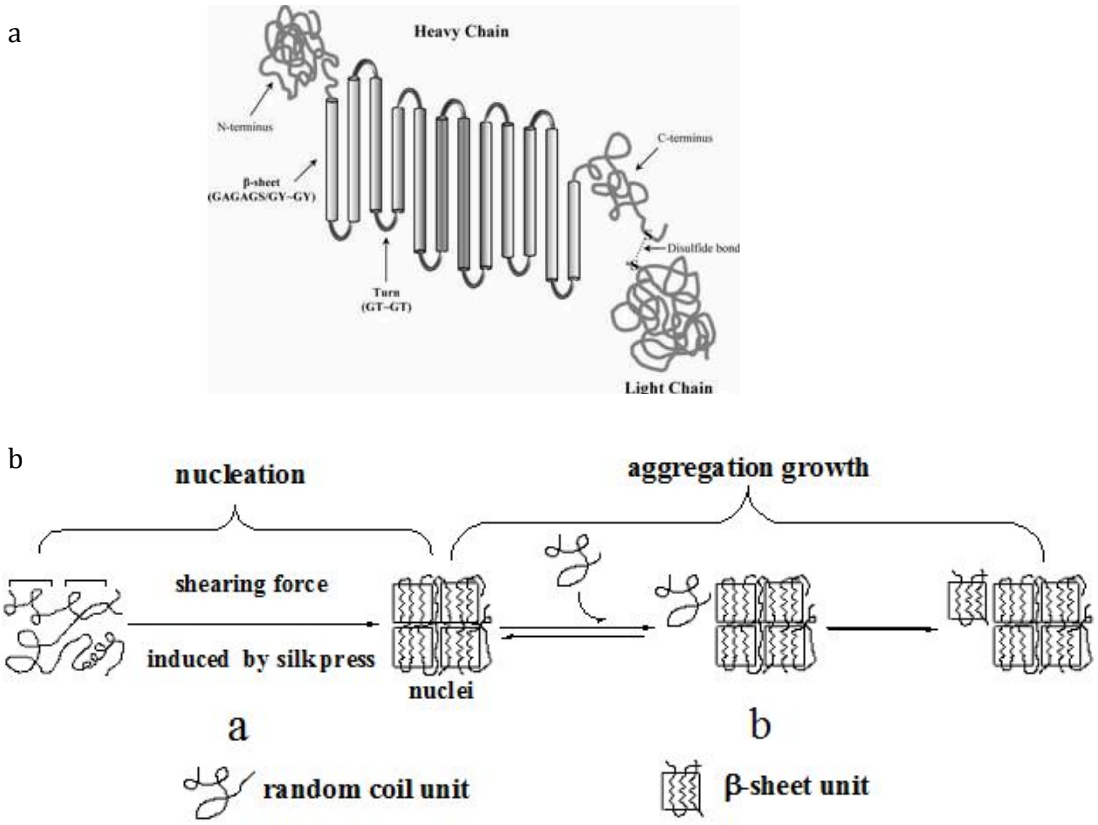

Figura 4. Esquema ilustrado de la organización molecular de la fibroína (a) y de los procesos de nucleación y agregación de la fibroína (b)(25).

La secuencia primaria de la fibroína da lugar a un polímero en estructura de co-bloque, en el cual las regiones cristalinas hidrofóbicas son interrumpidas por pequeñas regiones hidrofílicas que se combinan aleatoriamente (Fig. 4.a) (20). Los extremos N-terminal y C-terminal están muy conservados (21). En su conformación se distinguen dos dominios: una cadena ligera de unos 26 kDa y una cadena pesada de unos 390 kDa unidas por un puente disulfuro (22). La unidad estructural se consigue añadiendo al conjunto una glicoproteína de

unos 25 kDa llamada P25 (fibrohexamerina) que produce una unión no covalente de 6 bloques de cadenas ligeras y pesadas (23). Por tanto, las cadenas pesadas, las ligeras y P25 se ensamblan ajustándose a un ratio 6:6:1 (24).

Las sericinas (20-310 kDa) integran una familia de proteínas hidrofílicas encargadas de cubrir las fibras de fibroína (25). Éstas actúan a modo de pegamento permitiendo que las fibras se conformen en una estructura sólida, hueca y mecánicamente resistente, conocida comúnmente como capullo (Fig.3).

La SF de *B. mori* presenta los siguientes porcentajes en la composición en aminoácidos: 43% Gly, 30% Ala y 12% Ser (26). La cadena pesada está formada por:

- 12 dominios que forman la región cristalina (estructura en lámina-β) de las fibras (Tabla 1)(Fig. 5a). Los dominios cristalinos en las fibras consisten en repeticiones de Gly-X, pudiendo ser X: Ala, Ser, Thr y Val (Fig. 5b) (27). En *B. mori*, cada dominio cristalino se compone de subdominios de aproximadamente 70 residuos, que en la mayoría de los casos comienzan con repeticiones del hexapéptido Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser y terminan con el tetrapéptido Gly-Ala-Ala-Ser (27).

- Secuencias primarias (no repetitivas) que están menos organizadas y se intercalan con la lámina-β (Fig. 4a). Las regiones menos cristalinas de la cadena pesada de la fibroína, también conocidas como “enlazadoras o *linkers*” tienen entre 42 y 44 aminoácidos que no se encuentran en los dominios repetidos.

Seda de *Bombyx mori*				
Fibra de seda	**Fibroína** (72-81%)			**Sericina** (19-58%)
	Cadena pesada	Cadena ligera	Glicoproteína P25	Proteína tipo pegamento
Peso molecular	390 kDa	26 kDa	25kDa	~300 kDa
Polaridad	Hidrofóbica			Hidrofílica
Estructura	Seda I (estructura desordenada) Seda II (estructura cristalina) Seda III (estructura inestable)			Estructura no cristalina
Función	Proteína filamentosa que conforma la fibra en el núcleo de la estructura			Proteína de recubrimiento que une dos fibras de fibroína actuando como pegamento

Tabla 1. Características de las fibras de seda en *B. mori* (Modificado de Cao y Wang (28)).

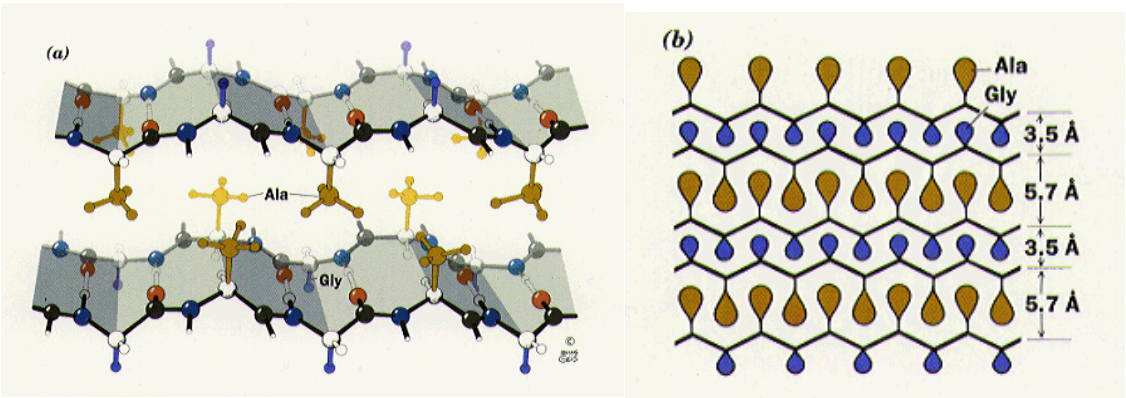

Figura 5. Estructura en lámina-β de la SF (a). Repeticiones Gly-Ala (b)(29).

Producción de la fibroína de seda

El hilado natural de la seda en *B. mori* presenta tres fases (Fig. 6). La fibroína es generada por las células que cubren la parte interior de las secciones distal y medial de la glándula sericígena. En el interior de la glándula, la fibroína presenta una conformación denominada seda I, un estado soluble y

micelar con un contenido en agua del 30% (Tabla 1). Cuando el insecto inicia el proceso de deposición de la seda para la realización del capullo, la fibroína va avanzando a través de la glándula sericígena y en la parte final de ésta, se recubre con la sericina, que es producida por las células situadas en dicho punto. El proceso de hilado va acompañado de una pérdida de agua y una tensión mecánica producida por el movimiento de la cabeza de la larva. Esta deshidratación y tensión inducen un cambio de fase en la solución metaestable de fibroína globular que pasa a una configuración de estructura secundaria en lámina beta, conocida como seda II (Tabla 1), que es la que se encuentra en la fibra de seda una vez que el insecto la "hila" en el capullo (30). Las estructuras en hoja-β son asimétricas, con un lado ocupado por los radicales de hidrógeno de las glicinas y el otro ocupado con las cadenas laterales de metilo de las alaninas que pueblan los dominios hidrófobos (Fig. 5a). Las hojas-β se disponen de modo que los grupos metilo e hidrógeno de hojas opuestas interactúan de forma que reducen tamaño y volumen (Fig. 5b). Esto es estabilizado por las fuerzas de van der Waals que generan una estructura termodinámicamente estable. Estos enlaces se forman entre aminoácidos perpendiculares a los ejes de las cadenas y las fibras. La seda II no contiene agua y es insoluble en la mayoría de los disolventes (26).

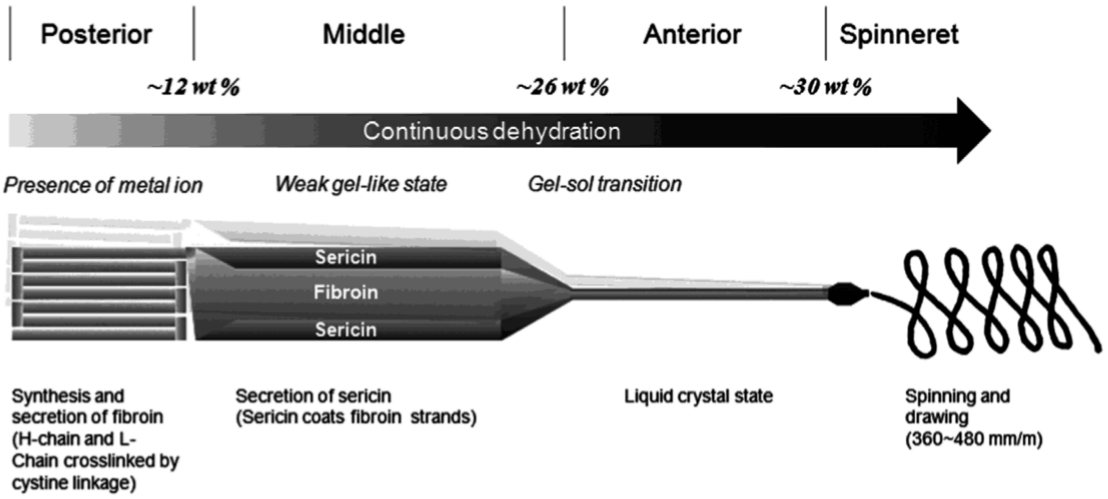

Figura 6. Glándula sericígena e hilado de *B. mori* (31).

1.2.2. LA FIBROÍNA DE SEDA COMO BIOMATERIAL

Las ventajas de la SF sobre otros biomateriales radican en sus excelentes propiedades mecánicas, una buena biocompatibilidad, un procesamiento basado en el agua, además de ser biodegradable y presentar grupos químicos fácilmente accesibles para introducir modificaciones funcionales (15).

La fibroína de la seda es purificada mediante el hervido de los capullos en solución salina para eliminar la sericina en un proceso llamado “desgomado” (Fig.3). El disolvente más habitual de la fibroína nativa es el bromuro de litio en solución acuosa 9,3M y en caliente. Otros disolventes comúnmente empleados son el cloruro cálcico disuelto en agua, o una mezcla de etanol, cloruro cálcico y agua. Por otro lado, hay otros disolventes como el metil-tiocianato que son menos utilizados (17). Antes de ser empleada como material de partida para la elaboración de biomateriales, se ha de dializar la fibroína disuelta para eliminar las sales que contiene.

La fibroína disuelta en agua es el material de partida para la fabricación de casi todos sus biomateriales derivados. Para su conservación se puede eliminar el agua mediante liofilización, obteniéndose lo que se llama “fibroína regenerada”. Ésta mantiene las propiedades de solubilidad, pudiendo disolverse en agua y en otros disolventes tales como el ácido fórmico y el hexafluoroisopropanol (**HFIP**) que no tienen la capacidad de disolver la fibroína nativa. La fibroína regenerada tiene menor resistencia mecánica que la fibroína nativa, ya que los enlaces que forman la estructura en lámina beta se rompen en el proceso de disolución. Así, los biomateriales consistentes en seda regenerada han de ser sometidos a un tratamiento que produzca un aumento en el contenido de estructuras en lámina-β para insolubilizarlos e incrementar su resistencia. Este proceso se conoce como “cristalización”. El tratamiento más empleado para incrementar el porcentaje de lámina-β es la inmersión del material en una solución de metanol. La inmersión en metanol hace que el material resultante sea más quebradizo. También se puede utilizar un tratamiento menos agresivo que consiste en exponer el material de seda

regenerada a vapores de metanol en caliente. Un procedimiento alternativo de cristalización se basa en tratar el material con vapor de agua en vacío. El porcentaje de lámina-β así obtenido es menor, lo que implica también una menor resistencia mecánica a diferencia del tratamiento con metanol. Sin embargo, las propiedades del material resultante en términos de elasticidad, transparencia y biocompatibilidad son mejores (30,32).

1.2.2.1. Propiedades de la fibroína de seda como biomaterial

A. Biocompatibilidad

La característica principal de un biomaterial ha de ser la biocompatibilidad. Un material implantado no debe desencadenar una reacción inflamatoria, ya que esto anularía su función. En el caso de la seda, existe una tradición de siglos en su uso como material de sutura. En esta aplicación, existe abundante información que indica la posibilidad de aparición de reacciones inflamatorias en los puntos de sutura (19). Sin embargo, estudios más recientes indican que, en realidad, estas reacciones son debidas a la sericina y que una fibroína perfectamente limpia de la misma no induce ninguna respuesta inflamatoria (33).

Santin y col. comprobaron que las membranas de fibroína pura producen un nivel de activación de macrófagos inferior al producido con poliestireno y polimetacrilato (34). Panilaitis y col., por su parte, observaron *in vitro* que las fibras de seda sin sericina eran inmunológicamente inertes en un cultivo de macrófagos de ratón RAW 264.7, mientras que las partículas de fibroína insoluble sí que activaban la producción de TNF (33). Curiosamente, la sericina soluble no activa la reacción de los macrófagos, sino que es la presencia conjunta de fibroína y sericina, la que resulta inmunogénica.

Meinel y col., en estudios *in vivo* e *in vitro*, compararon la producción de citoquinas inflamatorias inducidas por membranas de fibroína, colágeno y ácido poliláctico (**PLA**), sobre las que sembraron células mesenquimales humanas para implantarlas intramuscularmente en ratas (35). La producción de

citoquinas inflamatorias *in vitro* fue similar en fibroína, colágeno y el control de plástico, mientras que la tasa de proliferación celular fue superior en la membrana de fibroína. En el estudio *in vivo* se comprobó una leve respuesta inflamatoria producida por la fibroína a nivel histológico, que fue menor que la observada en el implante de colágeno, y mucho menor que la observada en el implante de PLA. En conjunto, los resultados de este estudio indicaron que la fibroína es menos inmunogénica que cualquiera de los biomateriales habituales, cuando se encuentra purificada de sericina.

A pesar de los resultados alentadores, todavía quedan algunas preguntas sobre la seguridad a largo plazo de los biomateriales de seda en el cuerpo humano. En primer lugar, las suturas de seda empleadas para la cicatrización de heridas permanecen en el organismo durante un tiempo limitado. En la ingeniería de tejido se requieren productos de seda para estar en contacto con los tejidos durante un período de tiempo prolongado, por lo que es necesario realizar estudios acerca de las respuestas a largo plazo de sistema inmune basadas en la ubicación y tipo de constructo usando modelos *in vivo* (15). En segundo lugar, preocupa la reacción inmune en respuesta a los productos degradados de biomateriales de seda. Una de las causas principales de fracaso de cualquier biomaterial implantado es la generación de partículas de desecho que puedan activar el sistema inmune. Se ha visto que los fragmentos de fibras de seda son capaces tanto de inducir la producción de citoquinas pro-inflamatorias leves, como de aumentar la fagocitosis (36). Otra investigación sugiere que los productos degradados de SF también pueden causar amiloidogénesis provocando una degeneración tisular (37). Es, por tanto, necesario realizar más investigaciones orientadas a la respuesta inmune del organismo tras períodos largos en contacto con este biomaterial.

B. Propiedades mecánicas

La seda ofrece un equilibrio atractivo entre la resistencia a la rotura y el alargamiento, lo que contribuye a su buena tenacidad y ductilidad (15). Las curvas de tensión-deformación de las fibras de seda en gusanos de seda salvajes muestran un aspecto y un endurecimiento por deformación similares a la seda de las telas de araña (38). Teniendo en cuenta las ventajas

excepcionales que proporcionan las propiedades mecánicas de la seda (resistencia, elasticidad, tenacidad…), no es de extrañar que ésta haya sido objeto de estudio en el campo de la ingeniería de tejidos para el desarrollo de *scaffolds*.

Como se ha comentado anteriormente, a pesar de las propiedades presentadas por las fibras de seda nativas, la mayoría de los materiales de seda desarrollados a partir de solución de SF son débiles y quebradizos. Por ejemplo, la resistencia a la tracción en seco de la película de seda es de aproximadamente 0,02 GPa y la rotura por alargamiento es menor del 2% en comparación con fibras nativas que tienen una resistencia a la tracción de alrededor de 0,5-0,6 GPa y la rotura por alargamiento es del 10-40% (38,39). Tales diferencias pueden ser atribuidas a la falta de estructura secundaria y jerárquica apropiada en los materiales regenerados en comparación con las fibras nativas (36,40). Hay estudios recientes que muestran aspectos donde mejorar significativamente la resistencia de los productos de las sedas regeneradas. A través de la manipulación de la estructura durante la regeneración se ha llegado a igualar o incluso a superar el grado de resistencia de las fibras nativas (41,42).

C. Biodegradación

La velocidad de degradación, la naturaleza de los productos de degradación y el metabolismo de los mismos es una consideración crítica a la hora de elegir y desarrollar un biomaterial. Éste debe degradarse y reabsorberse con el tiempo, pero a una tasa que permita a las células sembradas en el mismo diferenciarse y organizar una estructura tisular adecuada (30).

De acuerdo con Vert y col., la biodegradación se define como la degradación de un polímero implantable por elementos biológicos que dan fragmentos que pueden moverse fuera del sitio a través de la transferencia de fluidos, pero no necesariamente del cuerpo. Por otro lado, definen la bioabsorción como la eliminación total del material tanto a través de la filtración como de la metabolización de los bioproductos degradados (43). La

biodegradación de seda se estudia basándose en la pérdida de masa, cambios en la morfología y el análisis de los productos degradados *in vitro*. En modelos animales, la degradación se estudia a través de las propiedades mecánicas de la seda después de un cierto tiempo tras la implantación y el estudio de la integridad estructural a través de exámenes histológicos, tinción fluorescente y diversos ensayos bioquímicos (15). Como constructo implantado, el biomaterial de SF regenerada se degrada mucho más rápido que las fibras. La velocidad de degradación depende de la estructura secundaria de la seda resultante de la preparación de los materiales de seda regenerada (44).

Hay evidencias de la degradación *in vivo* de la seda en estudios que revelan que *scaffolds* 3D de seda basados en agua implantados en ratas Lewis se desintegran tras unas pocas semanas y desaparecen completamente después de 1 año. El sistema inmune del huésped tiene un impacto significativo en la degradación de la SF en *scaffolds* 3D porosos y en la degradación de la esponja de seda mediante una respuesta mediada por macrófagos, lo que sugiere que la seda no sólo es biodegradable sino absorbible (45).

Las células *in vitro* también están implicadas en la degradación de la seda. Osteoblastos y osteoclastos podrían erosionar *films* de seda a través de la expresión de metaloproteinasas e integrinas (46). Tales resultados son alentadores porque la matriz extracelular nativa se remodela continuamente *in vivo* por la degradación proteolítica a través de metaloproteinasas y la regeneración de la matriz (47).

La seda tiene claras ventajas sobre otros biomateriales en varios aspectos de la biodegradación. En biomateriales sintéticos como poliglicólidos y polilactidas los productos degradados se reabsorben a través de vías metabólicas, pero preocupa la liberación de subproductos ácidos. No hay tales problemas asociados con la seda. Además, los materiales sintéticos pueden reducir las propiedades mecánicas de forma temprana durante la degradación (48). Por otro lado, la fuerza de retención durante un largo tiempo por muchos sistemas de seda puede ser una ventaja, particularmente en la ingeniería de

tejidos, donde la degradación lenta y la capacidad de soporte de carga son necesarias.

D. Funcionalización de la superficie

Actuar sobre la superficie de los biomateriales abarca desde cambios físicos en la superficie, en términos de rugosidad e hidrofobicidad que modulan la adhesión celular, hasta la activación de cascadas bioquímicas complejas regulatorias de la proliferación, diferenciación y supervivencia celular. Los grupos reactivos que un biomaterial presenta en su superficie condicionan el enlace químico que se puede establecer y, por tanto, los ligandos posibles en esta unión. En este sentido, la fibroína presenta un porcentaje significativo de aminoácidos reactivos en su composición, 12,1% de Ser, 5,3% de Tyr, así como Thr, Glu y Asp, que pueden ser modificados con reacciones bien conocidas (49).

La reacción de carbodiimidas es la más habitual para unir proteínas o péptidos a la fibroína mediante un enlace covalente tipo amida entre ácidos carboxílicos y aminas primarias. En el caso de la fibroína se presentan varios aminoácidos con grupos carboxilo libres en cada molécula: 25 residuos de Asp, 30 de Glu y 12 de Lys. Con este método se han unido a Lys la proteína morfogenética de hueso (BMP-2) (50,51), el péptido de adhesión RGD (Arg-Gly-Asp) y la enzima peroxidasa (49).

Además de su aplicación como agente fijador de tejidos biológicos, el glutaraldehído también puede ser utilizado como agente de acoplamiento inespecífico entre polímeros y moléculas portadoras de grupos amino. Así se ha utilizado para conjugar insulina a nanopartículas de fibroína e incrementar su estabilidad (52,53).

En la revisión de Murphy y Kaplan se describe, además, el desarrollo de otras estrategias para casos particulares, como son la reacción activada por cloruro de cianuro, la sulfatación de la tirosina o la modificación de la tirosina con grupos diazonio. Otras posibilidades para unir moléculas a la fibroína, al margen de las uniones covalentes, son la adsorción a través de uniones de

hidrógeno y uniones electrostáticas. También se han realizado trabajos en los que se aprovecha la acción de las proteasas para la liberación lenta de moléculas de interés que han quedado físicamente dentro de las estructuras de fibroína en el proceso de fabricación (49).

La SF es soluble en agua en sus formas α-helicoidales y bucles al azar. La solubilidad puede mantenerse durante días e incluso semanas, dependiendo de la temperatura de almacenamiento, pH y concentración de la solución de seda (54). La posibilidad de preparar biomateriales de seda mediante un procesado basado en agua y en condiciones suaves tales como la temperatura ambiente o un pH neutro, favorece la unión a este material de moléculas que requieren de estas características (15).

1.2.2.2. Presentaciones de la fibroína como biomaterial

A través de procesamientos con disolventes acuosos u orgánicos, se dispone de una variedad de métodos con los que generar los biomateriales de seda para una amplia gama de aplicaciones. Se incluyen métodos para fabricar hidrogeles, esponjas, tubos, materiales compuestos, fibras, microesferas y películas delgadas (*films*)(Fig. 7). Esta variedad de configuraciones permite que puedan ser utilizadas directamente como biomateriales para implantes, como *scaffolds* en ingeniería de tejidos y en modelos *in vitro* de enfermedades, así como para la administración de fármacos.

A. Mallas electrohiladas

El *electrospinning* o proceso de electrohilatura consiste en la proyección de un chorro de disolución polimérica en un campo eléctrico con una elevada diferencia de potencial, lo que consigue adelgazar el diámetro del chorro del polímero hasta una escala nanométrica gracias a las fuerzas electrohidrodinámicas que genera el campo eléctrico. Cuando el chorro se deposita sobre una superficie plana, produce una malla plana de fibras superpuestas distribuidas al azar y de elevada porosidad (Fig. 8)(30). El equipo necesario para llevar a cabo el electrohilado consiste básicamente en tres

elementos: una fuente de alto voltaje, una bomba que alimenta al inyector capilar o aguja conectado a la corriente y una placa o cilindro colector conectado a tierra. La realización de la técnica no ha cambiado significativamente desde su invención, atribuida a Formhals en 1934.

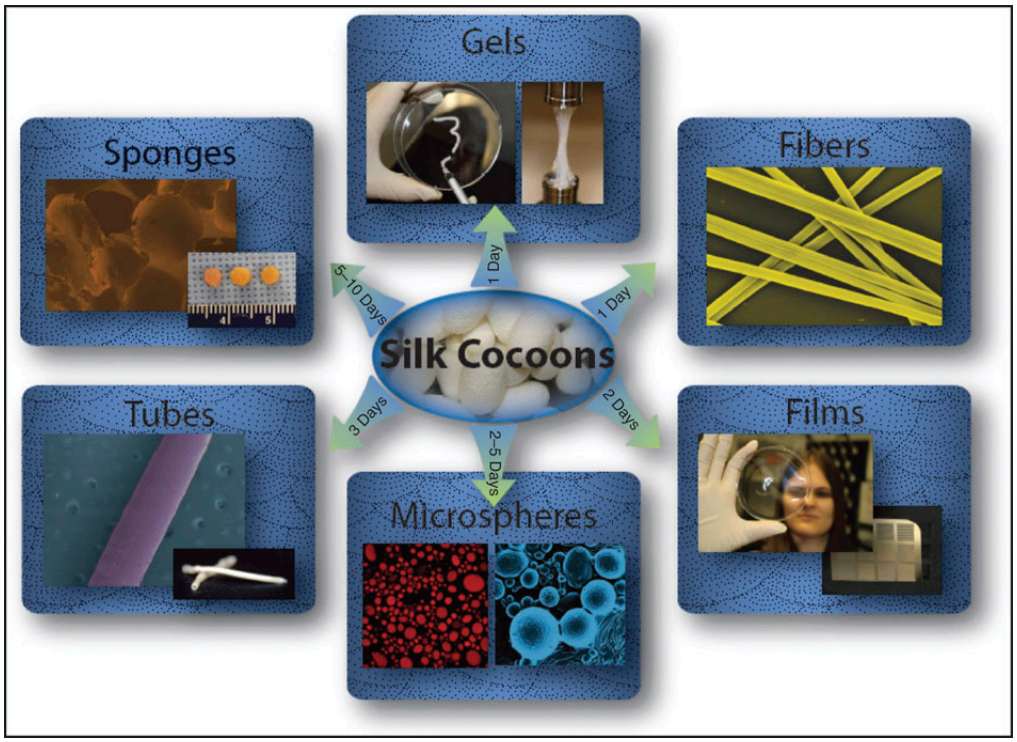

Fig. 7. Presentaciones de la SF como biomaterial (tomado de Rockwood, 2011 (55)).

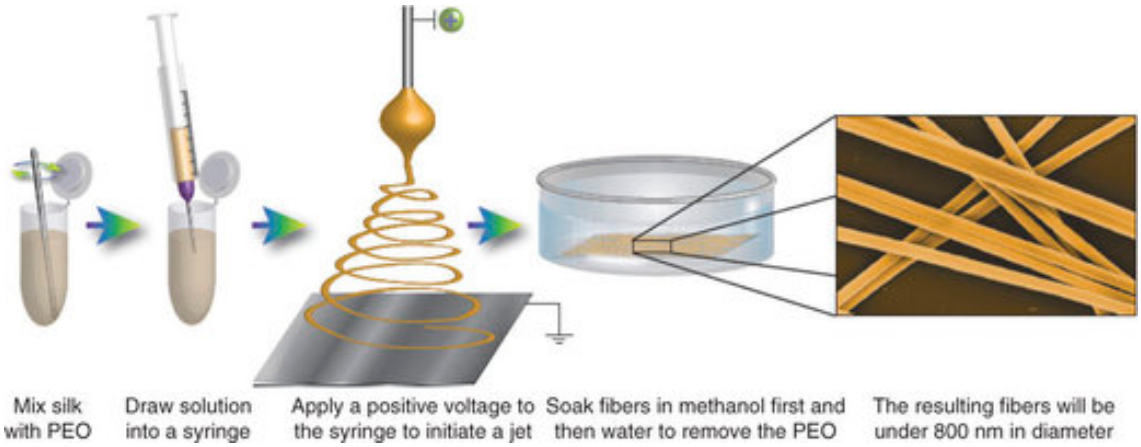

Figura 8. Figura ilustrativa del proceso de electrohilado y vista macroscópica de la malla de nanofibras generada (tomado de Rockwood, 2011 (55)) .

La técnica de electrohilatura tiene una larga trayectoria de aplicación en entornos industriales para la fabricación de filtros y recubrimientos, pero en la

última década se ha considerado su potencial en el campo de la bioingeniería. Esto ha ocurrido tras observar la similitud entre la matriz extracelular del tejido conjuntivo animal y la configuración tridimensional que adoptan las fibras de polímero producidas por electrohilado, por lo que se puede describir como una estructura totalmente biomimética (30). Algo similar se había conseguido con la matriz extracelular descelularizada obtenida mediante eliminación química de la células de un tejido animal (56).

B. Hidrogeles

La fibroína acuosa se presta bien a la fabricación de hidrogeles, estructuras tridimensionales de polímeros fuertemente entrelazados que absorben gran cantidad de agua pero no se disuelven en la misma (Fig. 9). Las nanofibrillas de lámina beta de la fibroína presentes en la solución se entrecruzan con facilidad cuando se dan las condiciones adecuadas de pH, concentración de la solución, concentración de calcio y temperatura. Sin embargo, la interacción entre estas variables es compleja y el proceso no es totalmente controlable, por lo que es frecuente que se produzcan gelificaciones espontáneas e indeseables en soluciones acuosas de fibroína almacenadas para su uso. La gelificación también se induce mediante la mezcla con polímeros como poloxamer y gelatina.

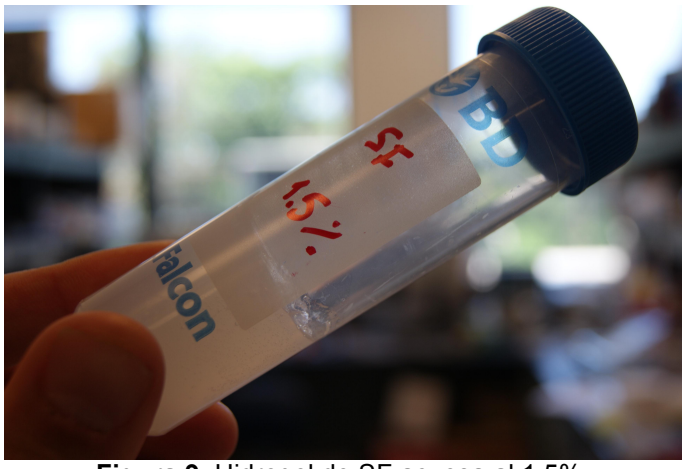

Figura 9. Hidrogel de SF acuosa al 1,5%.

Los hidrogeles son estructuras muy adecuadas para aplicaciones de encapsulación y liberación de células y citoquinas. Una evolución de este concepto es la combinación de seda y elastina para formar SELPs, polímeros

proteicos mixtos de seda/elastina, que en su fabricación permiten un control muy definido de sus características (57).

C. Esponjas porosas

Las esponjas porosas tridimensionales son estructuras ideales para su utilización en ingeniería de tejidos, ya que imitan estrechamente el microambiente fisiológico *in vivo*. Los *scaffolds* de seda se preparan por liofilización, lixiviación del porógeno (Fig. 10) y técnicas de fabricación libres de sólidos (58–60). Las esponjas liofilizadas poseen tamaños de poro por debajo de 100 μm, rariable que puede controlarse mediante el ajuste de la temperatura de congelación, pH de la solución y la cantidad de disolventes orgánicos empleados (59). El tamaño de los poros pueden aumentar de 60 a 250 μm con procesos repetidos de congelación y descongelación (58). A partir de métodos como la lixiviación de partículas mediante el uso de disolventes o la formación de espuma mediante gases, puede obtenerse un mejor control sobre la estructura de poro (60). El dominio que se ha conseguido sobre la porosidad de los *scaffolds* 3D en la SF ha favorecido su aplicación en ingeniería de tejido óseo y cartílago fundamentalmente (61).

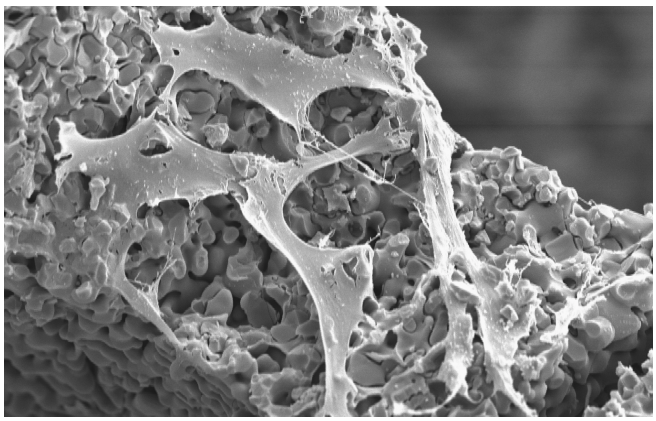

Figura 10. Ultraestructura de esponjas porosas de fibroína sembradas con células madre mesenquimales de médula ósea. Micrografía obtenida durante un experimento piloto realizado en el IMIDA (Murcia)(30).

Para obtener buenos resultados mecánicos y biológicos, los *scaffolds* 3D compuestos de seda se preparan incorporando rellenos inorgánicos (62) u orgánicos (63). Por lo general, los rellenos se añaden durante el proceso de

fabricación del *scaffold* para asegurar su distribución homogénea, aunque hay trabajos en los que esto se ha hecho posteriormente (62). Es fundamental una buena compatibilidad entre los componentes que integran los *scaffolds* 3D compuestos de seda para evitar la obtención de mezclas heterogéneas, separación de fases o reacciones tisulares adversas (64). Las modificaciones realizadas sobre estas esponjas porosas han conseguido mejorar las propiedades mecánicas de este material hasta alcanzar módulos de compresión de 13 MPa (65). Estos logros pueden ser suficientes para la regeneración de hueso esponjoso, pero insuficientes para los requerimientos de soporte de carga en la ingeniería de tejido óseo, por lo que es necesario seguir investigando para encontrar un sustituto a los soportes metálicos. En el caso de los ligamentos, se han empleado compuestos de seda reforzados con mallas de hilo de seda (66).

D. Micro y nanopartículas

Las micro y nano-partículas de seda se producen por liofilización y molienda, secado por pulverización, *jet breaking*, auto-ensamblaje y congelación-descongelación, a partir de una solución de seda. La fibra de seda en polvo es un enfoque alternativo para conseguir partículas de seda directamente de las fibras sin necesidad de utilizar ningún producto químico. Mientras que las partículas en polvo se utilizan para reforzar *scaffolds* y mejorar las propiedades mecánicas y los resultados al trabajar con células, las partículas de seda regenerada se utilizan principalmente en el transporte de fármacos. Una línea de investigación interesante es averiguar si las partículas pueden desempeñar la doble función de mejorar las propiedades mecánicas de los *scaffolds* y actuar como portadores de factores de crecimiento para la regeneración rápida de tejidos (15).

E. *Films* o películas transparentes

Los *films* de SF se pueden obtener a partir de la evaporación de disoluciones acuosas de esta proteína (67), disoluciones ácidas (41,67) o en líquidos iónicos (68), también mediante recubrimiento por rotación y por el proceso de Langmuir-Blodgett (68,69). Para producir películas muy delgadas se han utilizado técnicas de deposición manual capa por capa o el electrohilado

(16). Para mejorar la estabilidad de estas películas es necesario controlar también la cantidad relativa de hojas β o grado de cristalización de la SF, lo que puede lograrse mediante técnicas como el secado controlado (70), el estiramiento (71) y la inmersión en alcohol. A menudo, es necesario controlar las propiedades de la superficie de los *films* de seda para conseguir un crecimiento celular dirigido y mejorado o para cambiar las propiedades ópticas. La litografía y sistemas de impresión avanzados se emplean para lograr tales características (72,73). El caso de los *films* elaborados con fibroína regenerada en solución acuosa da como resultado una lámina transparente de una textura y aspecto similar al celofán (Fig. 11).

Figura 11. *Film* de SF, moldeado en la superficie de una placa de Petri, que pone de manifiesto la transparencia del mismo (tomado de Aznar 2013 (30)).

1.2.2.3. Aplicación de la fibroína de seda en ingeniería de tejidos

La sustitución de una parte del cuerpo humano con un biomaterial requiere una buena comunicación entre el receptor y el sistema implantado para un resultado exitoso. Las limitaciones de los implantes existentes abarcan desde una baja calidad del material o rápida degeneración hasta deformaciones en el material o un coste muy elevado (15). A continuación, se ofrece una relación de los trabajos orientados a superar estas limitaciones mediante el empleo de biomateriales basados en SF a través de las distintas

presentaciones comentadas en el apartado anterior.

A. Regeneración de tejido vascular

Entre los materiales adecuados para sembrar células endoteliales se encuentran las fibras de seda, y así aparecen descrtitas en la literatura científica (74). Sin embargo, es importante la elección de las células empleadas, ya que se han encontrado células endoteliales humanas primarias y líneas celulares de endotelio (HPMEC-ST1.6R e ISO-HA-1) incapaces de llenar los vacíos entre dos fibras de seda adyacentes (75). No obstante, se han publicado trabajos que sugieren un desarrollo positivo hacia la construcción de tejido vascular nativo mediante la optimización de co-cultivos de células endoteliales y células musculares lisas para obtener un endotelio bien organizado (76), la sulfatación de la seda para una mejor actividad anti-coagulante (77) o el revestimiento con matrigel para mejorar la cobertura de endotelio (76).

B. Regeneración de tejido neural

El sistema nervioso humano se divide en sistema nervioso central y periférico. El sistema nervioso periférico es capaz de auto-reparar lesiones menores, mientras que las lesiones mayores necesitan ser tratadas quirúrgicamente con injertos nerviosos sustraídos de otras partes del cuerpo. Por lo tanto, en tales tratamientos, la ingeniería de tejidos adquiere una gran relevancia y la compatibilidad entre materiales para construcción de *scaffolds* y células neuro-progenitoras cobra importancia (15). Se han publicado diversos trabajos al respecto empleando SF. En 2007, Yang y col. observaron que la SF mantenía la viabilidad de ganglios de la raíz dorsal del sistema nervioso periférico y las células de Schwann sin afectar su fenotipo o funcionalidad normales (78). En otros trabajos, se ha detectado que materiales compuestos por SF y quitosano o poli(l-láctico ácido co-caprolactona) son capaces de cubrir un espacio de unos 10 mm en lesiones provocadas al nervio ciático en ratas (79–81), mientras que al asociar SF de *B. mori* y fibra de araña X® se consiguió salvar de forma efectiva una brecha de hasta 13 mm en un nervio en el plazo de 12 semanas (82). Madduri y col. exploraron la importancia de la disposición de las fibras, observando que en nano-fibras de seda alineadas se

producía una mejora de la longitud y el crecimiento de los axones de las neuronas sensoriales de los ganglios de la raíz dorsal y las neuronas motoras de la médula espinal en embriones de pollo, a diferencia de las fibras no alineadas, donde los axones tuvieron un crecimiento lento y una orientación aleatoria (83). Actualmente se explora la orientación de los poros y la adición de factores neurotróficos para un mejor crecimiento neuronal en los injertos nerviosos en los que se emplea seda (15).

C. Regeneración de piel

La SF se ha probado en cultivos con queratinocitos y fibroblastos humanos obteniendo resultados satisfactorios (71). Sin embargo, la compleja estructura de la piel requiere el empleo de *scaffolds* realizados con materiales compuestos. Las capas de SF con colágeno-I mejoran la adhesión y la dispersión de los queratinocitos, mientras que el recubrimiento con fibronectina favorece la adhesión celular y la dispersión dentro de la matriz, tanto en queratinocitos como en fibroblastos (32). Hay que destacar que el procesado de la seda también parece ser importante, ya que, en humanos, ambos tipos celulares prefieren las nano-fibras de seda tratadas con vapor de agua que el tratamiento con metanol (32). Otros compuestos de seda que se han utilizado con éxito son las nano-fibras de seda-quitina (84), seda-colágeno (85) y fibroína-colágeno recombinante reticulado intermolecular tipo humano (86). Además, los *scaffolds* formados por SF y alginato bien mezclados favorecen la re-epitelización, al ser capaces de regenerar todo el espesor de la piel en heridas infringidas empleando ratas como modelo animal de rata (87). Estos hallazgos sugieren que las mezclas con SF pueden tener una mejor perspectiva en la regeneración de la piel que la SF pura (15).

D. Regeneración de hueso

La ingeniería de tejido óseo basada en SF es una de las más ampliamente estudiadas (88). El hueso es un tejido conectivo especializado compuesto de matriz extracelular calcificada, que tiene colágeno tipo I e HA como componentes principales (89), por lo que el material para construir *scaffolds* en tejidos óseos debe asegurar dureza y la deposición de la matriz.

En este contexto, y junto con una buena biocompatibilidad, la SF es una elección racional por su elevada dureza y resistencia mecánica. En experimentos realizados empleando un biorreactor, los constructos de hueso basados en *scaffolds* de SF porosa son capaces de estimular el desarrollo avanzado de tejidos óseos en 5 semanas (61). Los *scaffolds* de SF también promueven la curación de defectos femorales en ratones *nude* mediante su cultivo previo con células madre mesenquimales humanas (90). Por otro lado, se ha conseguido la regeneración de hueso en forma de tejido mediante la unión de BMP-2 a *scaffolds* integrados por nanofibras de óxido de polietileno y SF (91) y con la incorporación de nano-partículas de HA en una matriz de seda se ha comprobado que mejora la regeneración ósea en diversos modelos animales (92,93). Estos *scaffolds* compuestos han conseguido curar por completo defectos óseos segmentarios en ratas Sprague-Dawley después de 12 semanas tras la implantación (92) o guiar, también a lo largo de 12 semanas, el crecimiento total en espesor de defectos de calota (8 mm de diámetro) en ratas (61). Además, se ha logrado inducir diferenciación osteogénica en células madre mesenquimales de la médula ósea de rata cultivadas sobre partículas de nano-HA incorporadas a una hoja de fibroína (94), obteniendo resultados similares al utilizar seda en hidrogel (95,96) o capas no tejidas (97).

La vascularización de modelos *in vitro* de tejido sigue siendo un problema, por lo que se necesitan investigaciones adicionales sobre la arquitectura de los *scaffolds* y la distribución de poros para obtener un tejido óseo en 3D completamente vascularizado. Hasta ahora, se ha conseguido que la pre-incubación de células en matrices de seda previa a la implantación en animales aumente la vascularización en el neo-implante, obteniendo una tasa de vascularización directamente proporcional al tiempo de incubación *in vitro* (98). Por otro lado, el co-cultivo de osteoblastos con células endoteliales en los *scaffolds* de seda da como resultado la formación de micro-capilares (99) y estructuras pre-vasculares (100), logrando en una implantación que estos micro-capilares prematuros sobrevivan al sistema de defensa del receptor y se conviertan en micro-capilares funcionales (101).

E. Regeneración de cartílago

El cartílago es un tejido conectivo no vascularizado ni inervado. Los *scaffolds* tridimensionales porosos de SF (36,102–104), las fibras electrohiladas tratadas con microondas inducidas por plasma de argón (105), la SF mezclada con quitosano (106) o las esponjas porosas de SF y quitosano reticulado con genipina (107), proporcionan un soporte adecuado para los condrocitos. El factor de crecimiento insulínico tipo 1 es una molécula reguladora en condrogénesis, por lo se puede incorporar en los *scaffolds* para lograr mejores resultados en la formación de cartílago (108). Los biorreactores proporcionan una estimulación y maduración mecánica de los constructos cartilaginosos (109), por lo que se deduce que los factores hidrodinámicos son importantes. Otros factores que deben tenerse muy en cuenta para la regeneración de los tejidos cartilaginosos son las fuentes de células, la arquitecturas de los *scaffolds*, los tamaños y distribución de los poros (110).

F. Regeneración de ligamentos y tendones

La ingeniería de ligamentos y tendones requiere de un material con una excelente combinación de resistencia mecánica, elasticidad, tenacidad e integridad estructural. Hay trabajos en los que se han incorporado células madre mesenquimales de médula ósea porcinas en suturas de seda cubiertas con laminina como puntos de sujeción. Como resultado, la organización de las células dentro del constructo se asemejó al ligamento nativo desde un punto de vista mecánico e histológico (111).

G. Regeneración de tejido cardíaco

La pérdida de cardiomiocitos después de una lesión reduce la función cardiaca, lo que conduce a un aumento de la morbilidad y la mortalidad. Un posible tratamiento es la ingeniería de un corazón artificial o un parche cardiaco *in vitro* seguido de su implantación. Las células madre mesenquimales de rata son capaces de generar parches cardíacos cuando se cultivan sobre SF revestida con quitosano o ácido hialurónico (112). Los temas críticos que quedan por resolver son la adecuación de los biomateriales puros o compuestos de seda que apoyen la resistencia mecánica de las válvulas del corazón, la formación de elastina mediante el empleo de sistema de co-cultivo

con células de fibroblastos, el empleo de suero humanos o lisados de plaquetas durante el cultivo *in vitro* para minimizar el rechazo del injerto en la ingeniería tisular (15).

H. Regeneración de tejido ocular

El uso de la SF en la regeneración de tejidos de la córnea ha obtenido mejores resultados que los aloinjertos (113). Los *films* de seda se apilan en una estructura porosa tridimensional que imitan fielmente la organización helicoidal de la córnea humana *in vivo*. Cuando estas estructuras tridimensionales se cultivan con fibroblastos corneales humanos y de conejo, las células revelan la morfología natural de los queratocitos de la córnea (114). En cuanto a la transparencia, los implantes de SF con células epiteliales colocados en córnea de conejo se convierten en translúcidos 4 semanas después de la implantación, mientras que la formación nueva de limbo y vasos sanguíneos ocurre a las 8 semanas. La regeneración completa de la córnea de conejo se produce a las 16 semanas, pero deja atrás varias piezas opacas procedentes de la degradación de los *scaffolds* (115). Para mejorar el rendimiento de la SF, ésta se ha recubierto con colágeno IV, fibronectina y mezclas de condroitín sulfato y laminina (116). También se ha informado con éxito de la reconstrucción preclínica de epitelio limbal humano (117).

I. Regeneración de tejido hepático

El principal componente celular del tejido hepático son los hepatocitos, que se emplean *in vitro* para reconstruir el tejido hepático tridimensionalmente. Los materiales compuestos de seda para tejido hepático incluyen funcionalizaciones con lactosa y ácido cianúrico (118), *films* de SF mezcladas con colágeno (119), colágeno recombinante tipo humano (120), *scaffolds* compuestos de SF, colágeno y heparina (121) y otros con PLA incrustado en micro-partículas de seda (122). La mezcla de SF con colágeno causa una inflamación leve en el peritoneo de ratas (123). También es necesario mejorar la difusión de nutrientes a través de los grandes agregados que los hepatocitos forman a largo plazo en cultivo *in vitro* (15).

J. Regeneración de la médula espinal

El injerto de células envolventes olfativas (**OECs**, por sus siglas en inglés) es uno de los métodos más comúnmente empleados para el tratamiento de lesiones de la médula espinal. La regeneración de la médula mediante el empleo de seda se encuentra actualmente en sus inicios. El cultivo de OECs sobre SF dispuesta en nano-fibras ha obtenido resultados prometedores para el uso de biomateriales de seda en este campo (124). El diámetro de las nano-fibras posee efectos reguladores sobre el crecimiento de OECs (125); los diámetros menores proporcionan mejores respuestas celulares que las fibras más grandes.

K. Regeneración de tejido intervertebral

El tratamiento de la enfermedad degenerativa del disco intervertebral implica la reparación del anillo fibroso. Hasta ahora, no se ha conseguido imitar por completo la alta resistencia y la morfología elástica de los tejidos intervertebrales. Los *scaffolds* porosos de SF permiten un buen crecimiento *in vitro* de las células bovinas del anillo fibroso hasta 8 semanas (126), pero hay que tener en cuenta que el crecimiento de estas células está fuertemente influenciado por las condiciones del cultivo y por el tamaño medio del poro del *scaffold* (≥600 m)(127).

L. Regeneración de tejido de la vejiga urinaria

Para una reconstrucción exitosa de la vejiga en el tratamiento de la incontinencia urinaria por esfuerzo, se requieren estructuras en forma de vejiga con células musculares lisas y uroteliales autólogas (128). Los *films* de SF ofrecen un buen soporte a las células epiteliales de transición en las vejigas urinarias de conejos Nueva Zelanda (129). También en conejos se ha visto que los *films* reparan con éxito defectos de corta longitud (1,5 cm)(130). Se han llevado a cabo estudios similares con roedores (131,132). En cuanto a la función almacenadora de la vejiga, y Zou y col. diseñaron una bolsa basada en seda con células madre mesenquimales de la médula ósea que exhibió un buen control de la presión de los puntos de fuga al compararla con el control negativo (133).

M. Regeneración de tejido traqueal

La tráquea está constituida por una veintena de anillos de cartílago formados por tejidos fibrosos y elásticos y músculo liso. El tratamiento y la gestión de defectos traqueales siguen siendo un reto en la cirugía de cabeza y cuello. Con el fin de generar un sustituto traqueal clínicamente aplicable, durante décadas se han aplicado sin éxito una amplia variedad de materiales para injerto o trasplante. Sin embargo, el reemplazo de tejidos basado en estructuras integradas por seda biodegradable y células autólogas pueden representar una alternativa prometedora para satisfacer la escasez de injertos adecuados en la cirugía reconstructiva de la vía aérea (134).

Ni y col. ya demostraron la viabilidad de la SF para su uso en la reconstrucción de defectos traqueales. La experimentación en 12 modelos animales de conejo con defectos en la posición de la tráquea reveló que el espesor de la capa de fibroblastos que cubría la película porosa y no porosa de SF fue de 240,4 ± 9,9 y 302,3 ± 10,5 µm respectivamente. Asimismo, sobre el implante artificial, la membrana mucosa y el crecimiento ciliar fueron normales y no se produjo granuloma de cuerpo extraño ni infiltración de macrofagocitos alrededor de la cavidad traqueal reconstruida (135). Recientemente, Zang y col. estudiaron el potencial *in vitro* e *in vivo* de *scaffolds* a base de SF y quitosano, observando que esta estructura favorecía *in vitro* la adhesión, la proliferación y la diferenciación de condrocitos. Los experimentos en modelos de ratón desnudo revelaron que el *scaffold* de células envuelto en pericondrio mejoró de forma significativa la condrogénesis y dio lugar a una estructura con acústica mecánica (136).

N. Regeneración de la membrana timpánica

El tímpano o membrana timpánica es una membrana delgada situada entre el oído externo y el oído medio, constituida por un tejido similar a la piel y sensible a traumas o infecciones por los que puede perder su integridad. En la búsqueda de un material capaz de reparar todos los tipos de perforación timpánica, como alternativa a los injertos autólogos, aloinjertos y materiales de injerto sintéticos que ofrece la cirugía en la actualidad, la ingeniería de tejidos

ha propuesto una serie de biomateriales, entre los que se incluye la SF (88). Levin y col. investigaron la idoneidad de la SF como injerto alternativo en la cirugía miringoplástica, encontrando que la fibroína apoya el crecimiento y la proliferación de los queratinocitos humanos de la membrana timpánica (**hTMKs**) (134,135). Del mismo modo, Ghassemifar y col. estudiaron el uso de membranas de fibroína para el cultivo de hTMKs obtenidos a partir de explantes de la membrana timpánica. Tras 15 días en cultivo, hallaron que el crecimiento celular, la expresión de marcadores de fenotipo epitelial y queratinocitos y los complejos de adhesión celular fueron significativamente mayores en la membrana de SF que sobre la placa de cultivo (136). En conjunto, los estudios anteriores sugieren que las membranas de SF favorecen a las células hTMK y, por lo tanto, puede ser un substrato prometedor para la ingeniería del tímpano artificial (88).

O. Regeneración de tejido dental

La estructura del diente es una construcción compleja compuesta de esmalte, dentina, cemento (tejidos duros) y pulpa (tejido blando), vulnerable a los daños debidos a traumatismos, ácidos y ataques bacterianos. Las soluciones que ofrecen las estrategias de tratamiento convencionales no pueden restaurar la arquitectura fisiológica tisular ni la función del diente actualmente (137). La complejidad de las estructuras y los tejidos dentales complica la ingeniería de tejidos en este campo (138), pero el aislamiento de células madre adultas de la cavidad oral y el desarrollo simultáneo de materiales inteligentes, han mejorado mucho las expectativas (137). Xu y col. examinaron la utilidad de cuatro tipos de HFIP en *scaffold* de seda (diámetros de poro de 250 y 550 μm, con y sin péptido RGD), obteniendo un tejido mineralizado (osteodentina) más robusto en los poros de 550 μm con RGD a partir de células postnatales del germen dental de diente de rata y su posterior crecimiento en el omento de ratas durante 20 semanas. Además, mediante técnicas de imagen, comprobaron que el tamaño y la forma de los poros del *scaffold* de seda sirvió para guiar la formación de tejido mineralizado (139). Recientemente, Zhang y col. observaron que la elaboración de *scaffolds* empleando HFIP como disolvente favorecía la formación de pulpa dental tanto *in vitro* como *in vivo* (140).

1.3. EL GRAFENO

El carbono es uno de los elementos químicos más abundantes de la naturaleza. Es sólido a temperatura ambiente y puede encontrarse en distintas formas alotrópicas o como carbono amorfo, dependiendo de las condiciones de formación (Fig. 12). Las primeras formas alotrópicas conocidas del carbono fueron el grafito y el diamante. En el grafito, cada átomo de carbono está vinculado a otros tres en un plano compuesto de celdas hexagonales. Estos planos están unidos entre sí por fuerzas de Van der Waals. En el caso del diamante, cada átomo se une a otros cuatro átomos de carbono dando lugar a una estructura tridimensional rígida e isótropa (141). Posteriormente, se han descubierto otras estructuras, elevando a cinco el número de alótropos del carbono. En 1985, Kroto descubrió los fullerenos, donde los átomos de carbono se combinan formando hexágonos y pentágonos en una estructura cerrada en forma de esfera. En 1991, Iijima descubrió los nanotubos de carbono, que presentan una estructura en forma de redes hexagonales de carbono curvadas y cerradas. Ya en 2004, Novoselov y Geim consiguieron aislar por primera vez el **grafeno** a partir de grafito pirolítico altamente orientando, aunque el término había sido propuesto en 1996 para definir cada una de la capas del grafito. El grafeno puede definirse como un material bidimensional donde cada átomo de carbono se une a otros tres mediante enlaces sp^2 para formar una lámina plana. Más recientemente, Geim y Novoselov fueron galardonados con el Premio Nobel de Física 2010 por sus innovadores experimentos con el grafeno, un material bidimensional con unas propiedades físico-químicas extraordinarias (142).

Las láminas individuales de grafeno aisladas por Novoselov y Geim se obtuvieron utilizando una técnica de exfoliación mecánica conocida como *scotch tape*, que consiste en la exfoliación repetida de una pieza de grafito empleando cinta adhesiva. Hasta ese momento se creía que el grafeno sólo podía existir como constituyente básico de otros materiales grafíticos, ya que se suponía que los cristales estrictamente bidimensionales eran termodinámicamente inestables, por lo que su obtención aislada abrió la puerta a una nueva línea de investigación, la de los materiales bidimensionales (143).

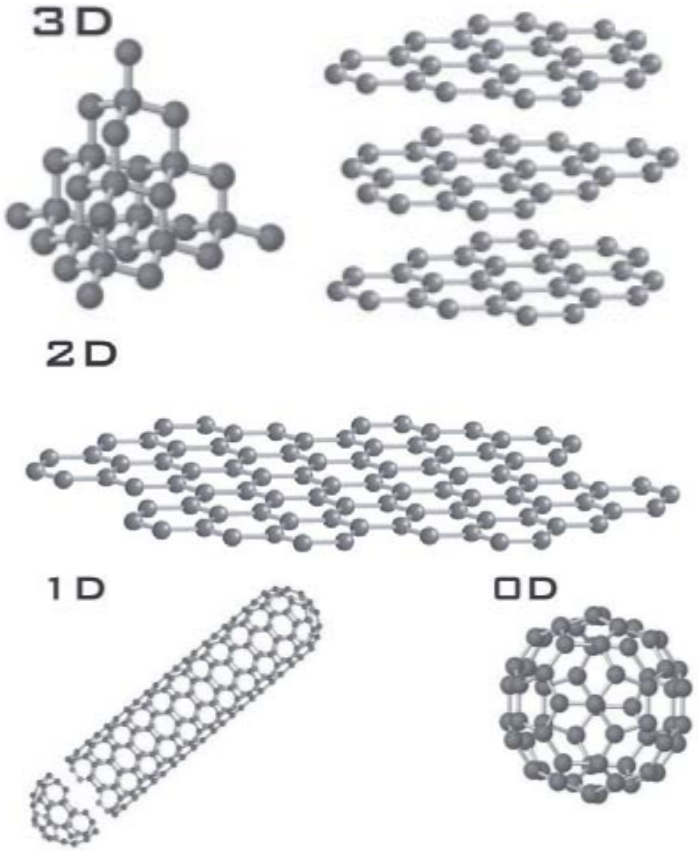

Figura 12. Formas alotrópicas del carbono: diamante y grafito (3D) grafeno (2D), nanotubos y fulleneros (0D) (tomado de Rodríguez-González 2008 (144)).

1.3.1. ÓXIDO DE GRAFENO

El óxido de grafeno (**GO**, por sus siglas en inglés *graphene oxide*) es una lámina de grafeno funcionalizada con diferentes grupos oxigenados, que se puede emplear como precursor del grafeno o como un material grafénico en sí mismo. Es aislante, higroscópico, con alto contenido en oxígeno y muy hidrofílico (145). El GO se suele sintetizar en dos pasos. En primer lugar, se realiza una oxidación del grafito, normalmente con agentes químicos en medio ácido, para obtener el óxido de grafito. En una segunda etapa, se produce una dispersión del óxido de grafito en un disolvente compatible seguido de una exfoliación (Fig. 13)(146,147). Una vez obtenido, el GO puede presentarse en

tres formatos: una suspensión en agua o en disolventes orgánicos, seco y molido para obtener polvo de GO o seco previo depósito en finas láminas para obtener *films* de GO (148).

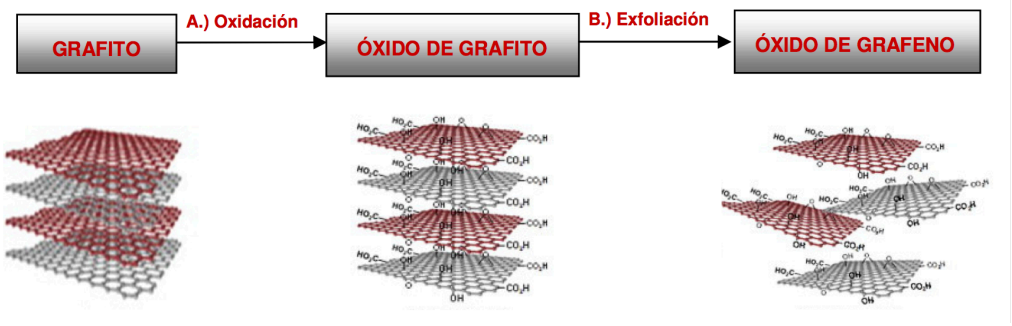

Figura 13. Etapas en la obtención de GO (tomado de García 2013 (142)).

A. Estructura del óxido de grafeno

La estequiometría del GO depende tanto del tipo de grafito del que provenga como de las condiciones del proceso de oxidación. Esta circunstancia dificulta el consenso acerca de su fórmula molecular, estructura, tipo y distribución de los grupos oxigenados. Sería más correcto, por tanto, hablar de óxidos de grafeno y no de óxido de grafeno, ya que éstos pueden ser sustancialmente diferentes entre sí (145). La Figura 14 recoge algunos de los modelos estructurales propuestos a lo largo de los años. En la actualidad, el modelo más aceptado es el de Ajayan, el cual incluye diferentes grupos oxigenados distribuidos al azar dentro de la lámina de GO (Fig. 14) (149).

B. Reducción del óxido de grafeno

Como se ha comentado anteriormente, el GO es una lámina de grafeno funcionalizada con grupos oxigenados. La pérdida de aromaticidad como consecuencia de la introducción de estos grupos es la causante de su carácter de aislante eléctrico. No obstante, la conductividad eléctrica se puede recuperar mediante la restauración de enlaces C sp^2, por lo que una de las reacciones más importantes en el proceso de preparación de grafeno es la reducción del GO (150). Debido a la agresividad del tratamiento, los óxidos de grafeno reducido (**rGO**) contienen en mayor o menor medida defectos que

pueden consistir en vacantes atómicas, agujeros o grupos funcionales remanentes (Fig. 15). Es muy difícil una restauración total de la estructura del grafito pristínico en el plano basal, siendo éste uno de los grandes retos en la actualidad (151).

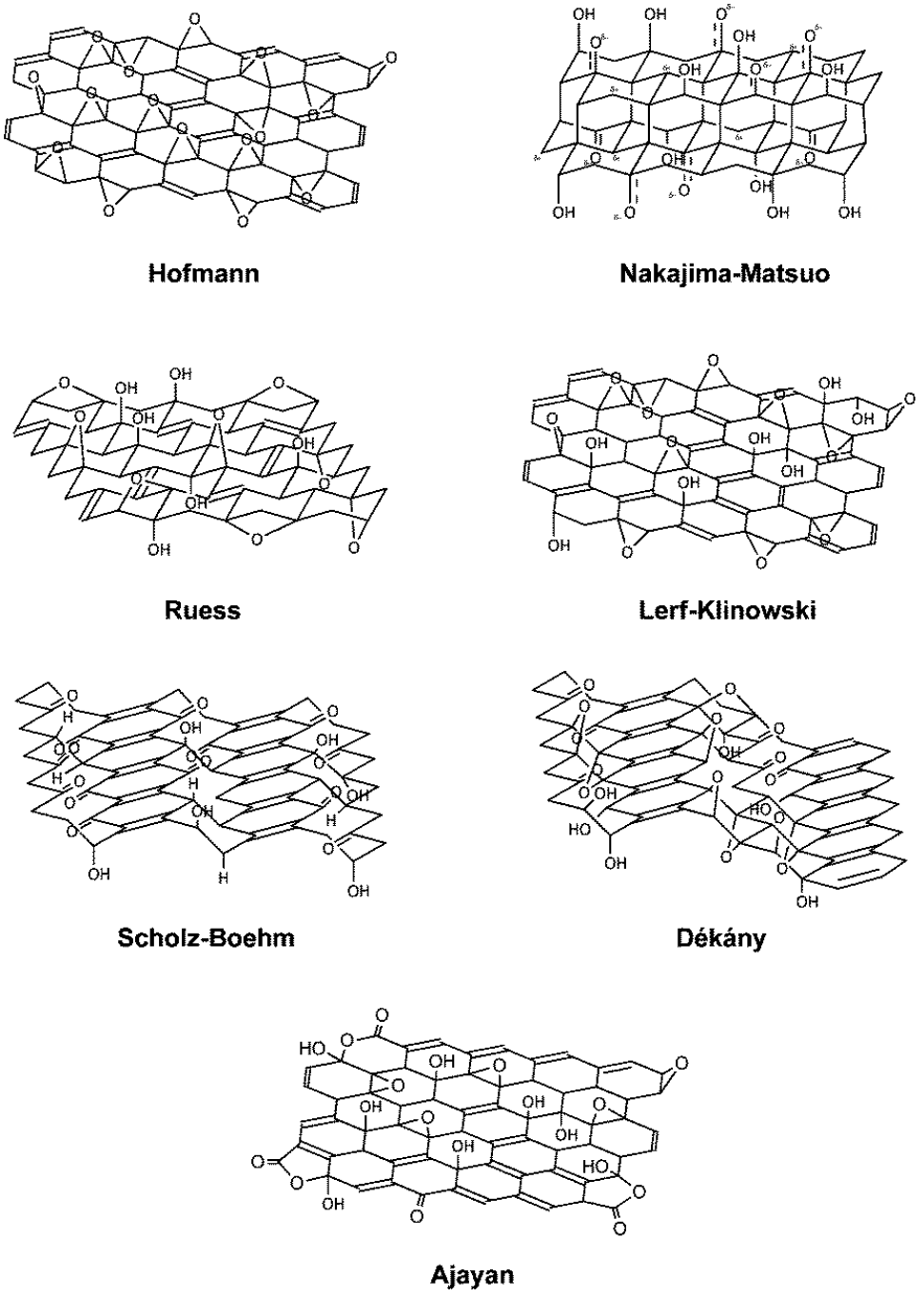

Figura 14. Modelos propuestos para la estructura del GO: Hofmann, Ruess, Scholz-Boehm, Nakajima-Matsuo, Lerf-Klinowski, Dékány y Ajayan (modelo actual)(tomado de Chua 2013 (149).

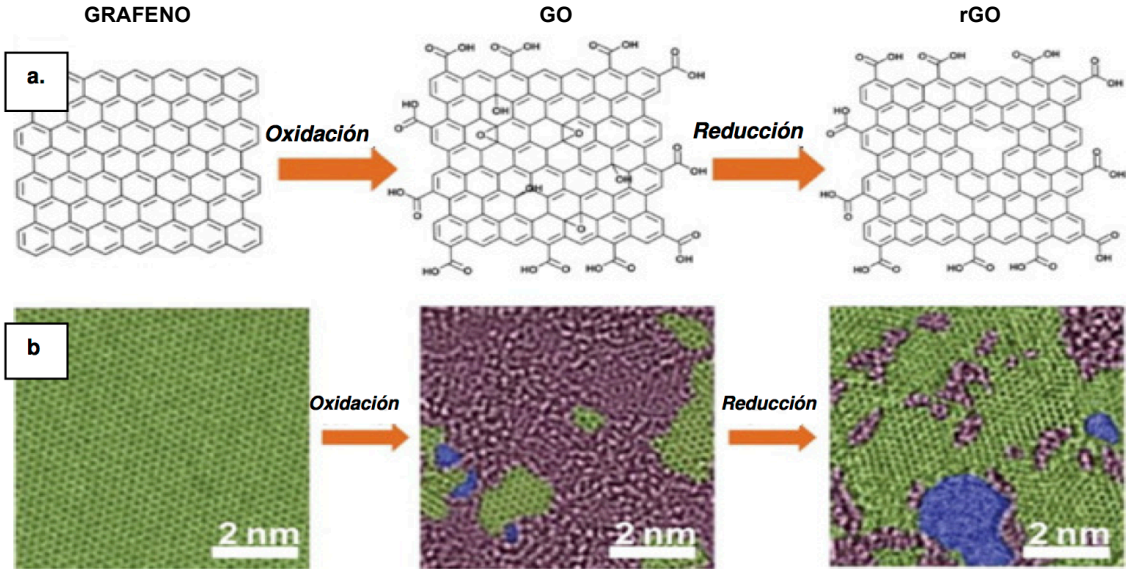

Figura 15. a. Modelo estructural de grafeno, GO y rGO. b. Imágenes de la estructura atómica del grafeno, GO y rGO obtenidas por microscopio electrónico de transmisión de resolución ultraalta. Las áreas verdes, moradas y azules representan dominios sp^2, dominios desordenados (sp^3) y vacantes atómicas en las láminas respectivamente (modificado de García 2013 (142)).

Es importante señalar que aunque los rGOs presentan menor conductividad eléctrica que los grafenos, debido a los defectos presentes en las láminas, estos defectos pueden ser rentabilizados para otro tipo de aplicaciones como la preparación de suspensiones sin necesidad de surfactantes o la ganancia de ciertas ventajas en pilas de combustible o en baterías. Por otro lado, su extrema sensibilidad a pequeñas variaciones en, por ejemplo, la química superficial o el grado de apilamiento, puede ser favorable para algunas aplicaciones como la detección, conmutación y almacenamiento de datos, la administración de fármacos, etc. (142).

Es sencillo distinguir el rGO de un GO por observación directa gracias a la coloración que adquieren estos materiales: color marrón-amarillo para el polvo de GO y negro para el polvo de rGO. Además, en el proceso de reducción tiene lugar la eliminación de grupos funcionales, aumentando la hidrofobicidad del rGO que precipita como un sólido negro. La reducción de GO puede alcanzarse a través de métodos químicos o térmicos, obteniéndose

productos que se aproximan al grafeno en diferentes grados estructurales y, en consecuencia, en sus propiedades eléctricas, térmicas y/o mecánicas (142).

Los métodos de reducción más habituales son aquellos que emplean agentes químicos. Entre ellos, el monohidrato de hidracina ($N_2H_4 \cdot H_2O$) es el más empleado al utilizarse para reducir el óxido de grafito antes de que fuera aislado el grafeno. La toxicidad de este compuesto hace que sea inapropiado para la síntesis de rGO en grandes cantidades, por lo que se han buscado otros agentes reductores para sustituirlo. Entre ellos están los híbridos metálicos como el borohidruro de sodio ($NaBH_4$) que es más eficaz que la hidracina con los grupos carbonilo. Sin embargo, su eficacia es baja con los grupos epoxi y los carboxílicos y es incapaz de eliminar los grupos alcohol. El ácido ascórbico se propone como sustituto de la hidracina, ya que no es tóxico y permita alcanzar relaciones atómicas C/O semejantes. Además de éstos, también se han empleado reductores como el ácido yodhídrico, la hidroquinona, la hidroxilamina o la urea, entre otros (145).

Dentro de la reducción química también se incluyen métodos como la reducción fotocatalítica (empleando catalizadores con TiO_2), la reducción electroquímica o la reducción solvotermal. Entre los inconvenientes que presenta la reducción química destacan que no permite la eliminación completa de los grupos funcionales y que además puede introducir heteroátomos en la estructura, como ocurre con el nitrógeno cuando se emplea la hidracina (142).

La reducción térmica se puede realizar a distintas temperaturas (generalmente 1000-1100 ºC) en diversas atmósferas (vacío, N_2, He, Ar, H_2, NH_3, N_2H_4, etc.) y/o empleando diferentes fuentes de calor (hornos eléctricos, hornos microondas, láser, plasma, corriente eléctrica o una punta AFM calentada). Dependiendo de las condiciones empleadas para su reducción, el rGO tendrá diferentes características. Una de las principales ventajas de la reducción térmica es que permite exfoliar y reducir directamente el óxido de grafito en un solo paso. La exfoliación térmica del óxido de grafito se produce porque los gases que se originan por la descomposición de los grupos funcionales (CO, CO_2, H_2O) generan una elevada presión entre las capas

provocando su separación. Los principales inconvenientes de la reducción térmica son la creación de defectos topológicos y vacantes producidos durante la eliminación de los grupos funcionales (150,151).

1.3.2. EL GRAFENO COMO BIOMATERIAL

Aunque los derivados del carbón han sido ampliamente empleados en la industria y la electrónica, su uso en medicina regenerativa está aún en una fase temprana. Los estudios prueban que el grafeno es altamente biocompatible, tiene baja toxicidad y una elevada capacidad de carga de fármacos (152).

1.3.2.1. Propiedades del grafeno como biomaterial

Dada la existencia de los nanomateriales de la familia del grafeno con diferentes propiedades físico-químicas, se espera que exhiban formas únicas de interacción con biomoléculas, células y tejidos basándose en características como el número de capas, dimensiones, funcionalización química, hidrofilicidad, etc. Es importante entender estas interacciones desde el punto de vista de las aplicaciones biomédicas, pero también por su toxicidad y biocompatibilidad (153).

A. Biocompatibilidad

Se cree que la generación de especies reactivas del oxígeno causantes del estrés oxidativo en las células diana son el mecanismo de toxicidad de los nanomateriales artificiales (154,155). Aunque no se conoce mucho con respecto a las vías de toxicidad para los materiales de la familia de grafeno, se cree que el estrés oxidativo puede ser una vía importante teniendo en cuenta su similitud química con los nanotubos de carbono (156–158). De hecho, se ha demostrado que el grafeno induce alto estrés oxidativo debido a la generación de especies reactivas del oxígeno de manera dependiente de la concentración y el tiempo, y se descubrió que la forma era un parámetro importante para determinar la toxicidad (158). En otro estudio llevado a cabo por Li y col. se

estudió la captación de grafeno utilizando diferentes líneas celulares (células epiteliales de pulmón, queratinocitos y macrófagos) mediante simulaciones de dinámica molecular y técnicas experimentales de formación de imágenes. Se demostró que las hojas de grafeno de 10 μm de grosor eran capaces de entrar en las células penetrando por el primer borde o la primera esquina de las membranas celulares y fueron completamente envueltos por las células epiteliales del pulmón y los macrófagos. Las microláminas de grafeno en forma de placa interrumpieron físicamente la organización del citoesqueleto de ambos tipos de células pero sin comprometer la viabilidad celular (159).

Al igual que en grafeno, Qu y col. estudiaron la necrosis inducida por GO y vinculada a la activación de la señal mediada por TLR4. La interacción entre GO y TLR4 dio lugar a daños en el citoesqueleto y estrés oxidativo conduciendo a una disminución en la función y viabilidad de los macrófagos. En la línea celular de macrófagos derivados de médula ósea deficientes en TLR4 no se observó necrosis desencadenada por GO, confirmando el papel de este receptor en la muerte celular (160). En otro estudio, se exploró el efecto del contenido en oxígeno en superficies de rGO dispuesto en capas sobre la adhesión y proliferación celular, encontrando que éstas disminuían conforme aumentaba el grado de reducción del rGO (161).

La citotoxicidad dependiente de la dosis que muestra el grafeno abre una aplicación hacia su actividad antimicrobiana. Se han realizado una serie de estudios informando sobre la actividad bactericida de los nanotubos de carbono, el grafeno, el GO y el rGO contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Por el contrario, se ha demostrado que la familia de bacterias *Shewanella*, con capacidad de reducir los metales, es capaz también de reducir el GO en cultivos en suspensión, perdiendo así el efecto antibacteriano del GO (153).

En el caso del GO, el trabajo realizado por Chaudhuri y col. ha logrado elimar los problemas de toxicidad celular combinando este material con polímeros de policaprolactona (162) y la publicaciones en las que se demuestra la capacidad del GO para inducir la diferenciación de células madre a linajes

osteo-, cardio-, neuro- y adipogénicos, se acompañan de resultados aceptables de viabilidad y proliferación (152,163–165).

B. Propiedades mecánicas

Las láminas de grafeno en monocapa presentan propiedades mecánicas excepcionales, mostrando valores de módulo de Young del orden de 1 TPa y resistencias a la tracción de ~130 GPa para deformaciones de 0.25% (147). Como consecuencia, se ha postulado el uso del grafeno como elemento de refuerzo en materiales compuestos, como los constituidos por grafeno-polímero. Aunque el grafeno presenta mejores propiedades mecánicas que el rGO debido a que los defectos y grupos funcionales de este último tienden a degradar sus propiedades mecánicas, la presencia de dichos grupos puede mejorar su interacción interfacial con la matriz polimérica, facilitando la transferencia de esfuerzos de la matriz a la lámina y consiguiendo con ello buenas propiedades mecánicas en el material compuesto final (166).

C. Biodegradación

El grafeno y otros materiales basados en carbono no son biodegradables, lo que preocupa por la potencial toxicidad pulmonar y los peligros ambientales (167,168). Los nanotubos de carbono de pared simple no muestran degradación biológica, pero su versión carboxilada puede someterse a la degradación por exposición a peróxido de hidrógeno y peroxidasa de rábano picante, o hipoclorito y la mieloperoxidasa de mamíferos (169–171). Tras estos datos, Kotchey y col. (172) publicaron que el GO, pero no el rGO, era susceptible a la biodegradación por ataque oxidativo usando peróxido de hidrógeno y peroxidasa de rábano picante. Este estudio puede conducir al diseño potencial de materiales biodegradables más seguros basados en grafeno.

D. Funcionalización del grafeno

El GO es más ampliamente utilizado que el grafeno para aplicaciones biomédicas debido a la presencia de grupos carboxílicos, epoxi e hidróxido, ya que permiten una amplia gama de reacciones y opciones de funcionalización. El GO ha sido funcionalizado con polímeros hidrosolubles y biocompatibles

como polietilenglicol, alcohol polivinílico, polietilenimina, N-poli-isopropilacrilamida, anhídrido polisebácico, quitosano, copolímeros anfífilos, grupos amino y los grupos sulfónicos (153).

En ingeniería de tejidos se ha empleado el quitosano para reforzar *films* de grafeno y *scaffolds* de hidrogeles integrados por GO y quitosano. Estos materiales compuestos mostraron mejores propiedades mecánicas y una menor tasa de degradación, además de un buen crecimiento celular y depósitos de fosfato de calcio en células MC3T3-E1 y ningún efecto tóxico en la línea L929 (173,174).

Los materiales basados en grafeno muestran interacciones únicas con DNA y RNA, que los hacen atractivos en la detección y liberación de estas moléculas. El GO adsorbe preferentemente la cadena simple de DNA sobre la cadena doble y protege los nucleótidos adsorbidos del ataque de las nucleasas abriendo así una amplia gama de posibles aplicaciones (175–178). Debido a las interacciones entre las cargas negativas del DNA y el GO, se ha logrado mejorar la adsorción de los pequeños oligómeros en soluciones de elevada fuerza iónica y a pH bajo (179). Los datos disponibles sobre la interacción de grafeno con lípidos son más reducidos, aunque se ha demostrado que el grafeno forma estructuras híbridas estables y funcionales con los lípidos usando simulaciones de dinámica molecular de grano grueso (180).

En cuanto a la interacción grafeno-célula, Mu y col. utilizaron nanoláminas de GO recubierto de proteínas (**PCGO**) en mioblastos esqueléticos (línea celular C2C12) (181) y observaron mediante microscopía electrónica de transmisión, citometría de flujo y ensayos de inhibición de la adsorción, que las nanoláminas pequeñas de PCGO (diámetro: 0,42 ± 0,26 μm; espesor de 3,2 nm) entraron en las células a través de endocitosis mediada por clatrina mientras que las nanoláminas grandes de PCGO (diámetro: 0,86 ± 0,37 μm; espesor 5,2 nm) utilizaron tanto la endocitosis mediada por clatrina como la fagocitosis.

Es evidente, por tanto, que la forma, el tamaño y la química de los materiales basados en grafeno desempeñan un papel importante en la determinación de sus interacciones con la membrana celular, la captación intracelular y el destino de las células. Hay una clara necesidad de potenciar los estudios *in vivo* para entender aspectos como la hemocompatibilidad o la respuesta inflamatoria antes de poder aprovechar completamente el potencial terapéutico de los materiales de grafeno (153).

1.3.2.2 Presentaciones del grafeno como biomaterial

A. *Films*

El uso de *films* de grafeno en el campo biomédico está mucho menos extendido que su aplicación tecnológica. Uno de los trabajos publicados a este respecto, fue la síntesis de *films* de grafeno mediante técnicas de CVD (por sus siglas en inglés *chemical vapor deposition*) recubiertas por laminina para estudiar el comportamiento de un modelo celular de cardiomiocitos de rata (182). Uno de los *films* de GO más sencillos desde el punto de vista de su fabricación, se elaboró utilizando métodos de autoensamblaje de GO para cubrir superficies de vidrio sobre las que se sembraron células madre derivadas de tejido adiposo, observando un efecto positivo en su capacidad de adhesión, proliferación y diferenciación (183). También se han desarrollado películas de grafeno/quitosano por el método *solution casting*, que facilitó la adhesión de la línea celular murina L929 (fibrosarcoma)(174). Más recientemente, nuestro grupo de trabajo ha propuesto la obtención de *films* de GO elaborados a partir de una dispersión acuosa de GO a 4 mg/mL y sometida posteriormente a evaporación, sobre los que sembraron células madre de ligamento periodontal humano (184). Otro formato en el que se han estudiado las propiedades intrínsecas del grafeno tanto *in vitro* como *in vivo* son los *films* de SGH (*self-supporting graphene hidrogel*), obteniendo la mínima formación de cápsulas fibrosas en implantes subcutáneos de rata así como una leve respuesta inmune (185).

B. Espumas

Las espumas de grafeno se han presentado como un material a tener en cuenta en la ingeniería de tejido nervioso. Li y col. propusieron por primera vez en 2013 la utilización de una espuma de grafeno con características de una estructura porosa tridimensional, como *scaffold* para células madre neurales *in vitro* (186). Para su obtención, emplearon la técnica de CDV utilizando espuma templada de níquel. Encontraron que este material mantenía un estado de proliferación celular activo e inducía la diferenciación de las células madre neurales hacia astrocitos y, especialmente, hacia neuronas.

C. Recubrimientos

La reciente revisión realizada por Gu y col. (187) propone el grafeno como un nuevo tipo de material de recubrimiento que puede conferir capacidad osteodiferenciadora a otros materiales utilizados para implantes y *scaffolds* modificando su superficie.

El GO es más ampliamente utilizado en investigación que el grafeno para aplicaciones biomédicas debido a la presencia de grupos carboxílicos, epoxi e hidroxilo, que permiten una amplia gama de reacciones y opciones de funcionalización. El GO ha sido funcionalizado con un número de polímeros hidrosolubles y biocompatibles como polietilenglicol (PEG), alcohol polivinílico (PVA), polietilenimina (PEI), poli-N-isopropilacrilamida, anhídrido polisebácico, quitosano, copolímeros anfifílicos, grupos amino y los grupos sulfónicos (153). Los conjugados de GO funcionalizado han demostrado ser adsorbentes eficaces para fármacos hidrofóbicos debido a su naturaleza anfifílica y dominios oxigenados no sustituidos de grafeno (188). Los extremos ramificados amino-terminales de PEG se utilizaron por primera vez para funcionalizar GO por conjugación de grupos ácidos carboxílicos con grupos amino de PEG, dando como resultado compuestos PEG-GO de tamaño nanométrico con una buena estabilidad en varias soluciones fisiológicas. Después de esto, se realizaron una serie de estudios *in vitro* e *in vivo* con PEG ramificado y lineal para funcionalizar GO (189–191). Las propiedades mecánicas de materiales de GO funcionalizados con PVA aumentaron a través de fuertes interacciones superficiales y enlaces de hidrógeno (192). Los

conjugados PEI-GO exhibieron una excelente capacidad para condensar el DNA y se utilizaron para la liberación de genes (193). Los enlaces amida se utilizaron para funcionalizar covalentemente GO y quitosano a través de grupos carboxilato y se utiliza para la administración de fármacos, la liberación génica y la cicatrización de heridas (173,194,195). Otros investigadores se han centrado en la funcionalización mediante enlaces covalentes con grupos carboxilato, epoxi o hidróxido, en la funcionalización mediante enlaces no covalentes e incluso en la formación de compuestos de GO y proteínas (153).

Aunque es necesario ampliar los estudios *in vivo*, ya se ha comprobado la capacidad del grafeno para mejorar las propiedades mecánicas y biológicas de otros materiales, así como la de promover la adhesión, proliferación y diferenciación osteogénica en células madre mesenquimales.

1.3.2.3. Aplicaciones del grafeno en ingeniería de tejidos

En los últimos años se han explorado diversas aplicaciones biomédicas a partir de materiales basados en el grafeno, aunque éstas son más limitadas que en el caso de la SF debido a que se trata de un material mucho más novedoso. El grafeno tiene excelentes propiedades mecánicas que compensan ciertas carencias presentadas por hidrogeles, *films* biodegradables, fibras electrohiladas y otros *scaffolds* empleados en ingeniería de tejidos (153). De hecho, la incorporación de GO en hidrogeles a base de PVA mejora significativamente la resistencia a la tracción (132%) y a la compresión (36%) del hidrogel sin afectar a su citocompatibilidad (196). Además, cuando Fan y col. probaron los *films* de quitosano y grafeno reforzados mecánicamente en la línea celular murina de fibrosarcoma L929, éstos no mostraron toxicidad (174). En otro trabajo, los *scaffolds* de hidrogeles integrados por GO y quitosano presentaron, al compararlos con quitosano solo, mejores propiedades mecánicas, menor tasa de degradación y capacidad para conservar tamaño y forma en condiciones de pH fisiológico y extremas, además de mostrar una mejora significativa en la adhesión, diferenciación, proliferación celular y la deposición de fosfato de calcio en células de pre-osteoblastos de ratón MC3T3-

E1 (173). Lu y col. exploraron la cicatrización de heridas mediante la incorporación de grafeno a *scaffolds* compuestos de nanofibras formadas por quitosano-PVA, obteniendo como resultado que las muestras que contenían grafeno curaron por completo y a un ritmo más rápido las heridas infringidas a ratones y conejos que los *scaffolds* sin grafeno o el control (197).

El grafeno también se ha considerado como un material a emplear en la ingeniería de células madre. Chen y col. (198) diseñaron estudios sobre plataformas de grafeno y GO para medir la proliferación y diferenciación de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs). Observaron que, en comparación con el vidrio, el GO mejoraba la proliferación y la diferenciación osteoblástica, mientras que en el grafeno la proliferación fue similar al vidrio y la diferenciación estuvo suprimida. Por lo tanto, los *scaffolds* recubiertas de GO se pueden usar para dirigir la diferenciación de iPSCs a linajes endodérmicos (hepatocitos y células β productoras de insulina), mientras que las superficies recubiertas de grafeno se pueden utilizar para el subcultivo y expansión de iPSCs, ya que mantienen su pluripotencia. Se han evaluado superficies recubiertas de grafeno con rigidez y rugosidad variables para la diferenciación de las células madre mesenquimales humanas (**hMSC**) y pre-osteoblastos en osteoblastos. El grafeno y las superficies recubiertas con GO exhibieron una acelerada adhesión, proliferación y diferenciación celular de hMSC en comparación con las cultivadas en polidimetilsiloxano, polietileno de tereftalato, vidrio, y los sustratos de Si/SiO_2 (199). Cuando se cultivaron en medio osteogénico, el grafeno aceleró notablemente la diferenciación de hMSC, a una velocidad comparable a la presencia de BMP-2 en superficies no revestidas. Curiosamente, las superficies de GO no desnaturalizaron la insulina promoviendo la diferenciación adipogénica mientras que el grafeno desnaturalizó la insulina debido a las fuertes interacciones π-π (200).

Los avances recientes en este campo incluyen la utilización de espumas de grafeno como *scaffolds* tridimensionales (3D) para células madre neurales (186). Estas espumas no sólo apoyaron la proliferación y diferenciación de células madre neurales hacia linajes neuronales, sino que también eran capaces de llevar a cabo una estimulación eléctrica en células neuronales

diferenciadas. En un estudio reciente, se fabricaron *scaffolds* 3D compuestos de metacrilato de gelatina (GelMa) y GO. La incorporación de GO en hidrogeles GelMa mejoró sus propiedades mecánicas y eléctricas sin ningún efecto adverso sobre fibroblastos encapsulados (201).

Las propiedades generales, mecánicas y eléctricas de los materiales de grafeno pueden ser útiles en el refuerzo de los *scaffolds* de ingeniería de tejidos. La literatura reciente indica que los compuestos basados en grafeno interconectados con tecnologías de micro/nanofabricación pueden conducir al desarrollo de *scaffolds* con propiedades dirigidas a los destinatarios de órganos/tejidos. Sin embargo, se ha de incidir más en la evaluación *in vivo* de la respuesta inflamatoria, la biocompatibilidad y el potencial regenerativo (153).

1.4. CÉLULAS MADRE

1.4.1. DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN

Las células madre o células troncales (traducción derivad del inglés *stem cells*) son células indiferenciadas que tienen capacidad para autorenovarse, dividirse produciendo copias de sí mismas y con potencial para diferenciarse en otros tipos de células. También tienen la particularidad de, en determinados ambientes, poder regenerar tejidos allí donde estén (202). El destino de una célula madre depende fundamentalmente de factores epigenéticos, así como de señales e influencias de su microambiente, ya sean mediadas por factores solubles o por el contacto directo con sus células vecinas y la matriz extracelular, es decir, de su nicho (203).

Hasta la fecha se han descrito varios tipos de células madre. Se pueden clasificar en función de su origen (embrionario o adulto), de su grado de diferenciación (potencialidad, plasticidad) o del tejido en que se encuentran, como son las células madre embrionarias, células madre embrionarias germinales, células madre embrionarias de carcinoma, células madre fetales y células madre adultas (204,205).

Atendiendo a su capacidad de diferenciación, las células madre se agrupan en:

- *Totipotentes*, son células capaces de generar los 220 tipos de tejido de un humano además de los tejidos extraembrionarios.
- *Pluripotentes* pueden generar cualquier estirpe celular del embrión (de naturaleza ectodérmica, mesodérmica o endodérmica) pero no células extraembrionarias.
- *Multipotentes*, las que sólo pueden dar lugar a un subconjunto de tipos celulares, dependiendo de la capa o linaje de tejido embrionario del que procedan. Por ejemplo, las células madre mesenquimales de médula ósea, de naturaleza mesodérmica.
- *Oligopotentes*, cuando este subconjunto es más reducido (una definición un tanto arbitraria).

- *Unipotentes*, si sólo pueden generar un tipo celular.

Gracias a los trabajos sobre reprogramación celular realizados por Gurdon y Yamanaka, por los que fueron galardonados con el premio Nobel de Medicina en 2012, se han conseguido obtener células madre pluripotentes a partir de células especializadas. Se trata de las llamadas células madre pluripotentes inducidas o iPS. Para su obtención, las células han de ser sometidas a una reprogramación genética mediante factores de transcripción de proteínas. En cuanto a su capacidad de diferenciación, son equivalentes, por tanto, a las células madre pluripotentes. Gurdon y Yamanaka revolucionaron la visión del desarrollo de los organismos al demostrar que las células especializadas pueden ser reprogramadas para desarrollar cualquier tipo de tejido.

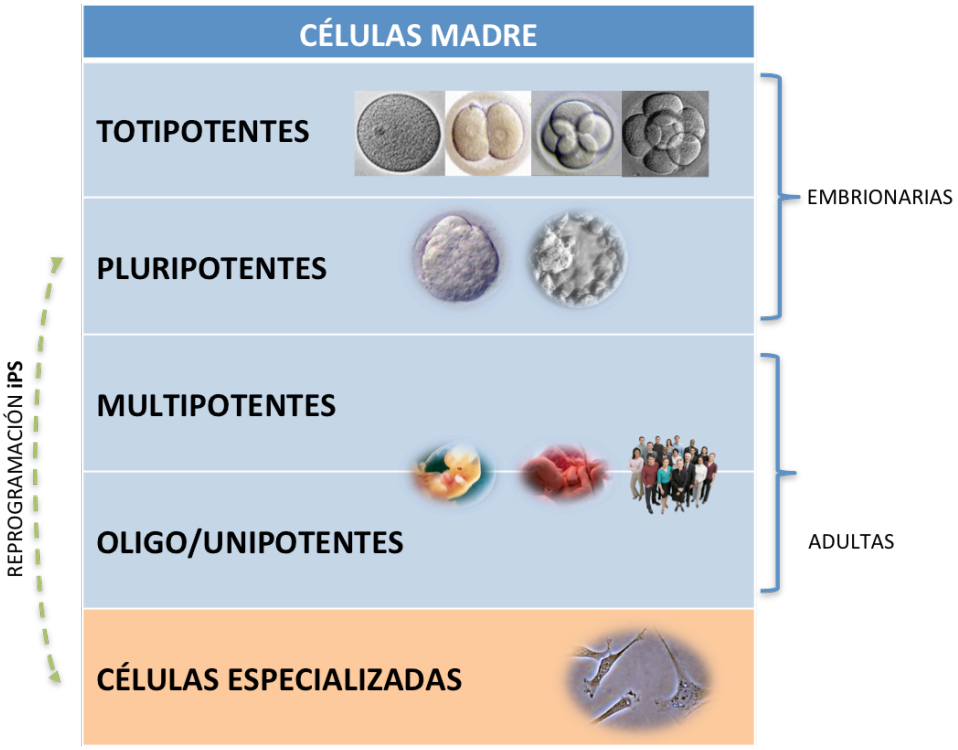

Figura 16. Clasificación de las células madre.

1.4.2. CÉLULAS MADRE DENTALES

La cavidad oral presenta un interés doble ya que se considera tanto

fuente como **sitio de aplicación** de las células madre adultas (10).

Una de las fuentes de células madre que más ha sorprendido a la comunidad científica y en especial a la dental, fue la que apareció en el año 2000 sobre células madre procedentes de la pulpa dental (**DPSCs**, por sus siglas en inglés), llevada a cabo por el grupo de Songtao Shi, quienes aislaron células madre de una fuente tan particular como es la pulpa dental. Fueron extraídas de terceros molares humanos y, además de demostrar capacidad clonogénica, fueron capaces de diferenciarlas hacia odontoblastos y formar el complejo dentinopulpar cuando fueron implantadas de forma subcutánea en ratas inmunocomprometidas. Se observó que estas células presentaban un mayor porcentaje de proliferación que las células madre mesenquimales de médula ósea (206).

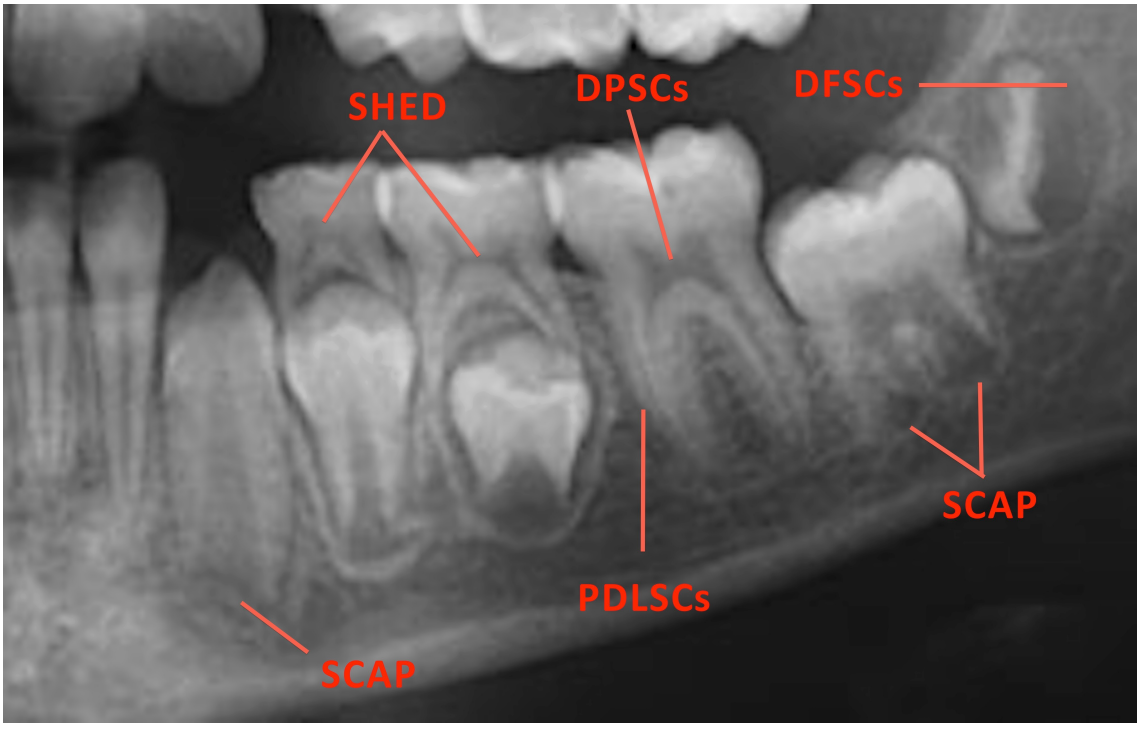

Figura 17. Fuentes de células madre dentales (tomado de Bossú 2014 (10)). SHED: *stem cells from human exfoliated deciduous teeth* (células madre procedentes de dientes decíduos exfoliados humanos); DPSCs: *dental pulp stem cells* (células madre de la pulpa dental); DFSCs: *dental follicle progenitor stem cells* (células madre progenitoras del folículo dental); SCAP: *stem cells from apical papilla* (células madre de la papila apical); PDLSCs: *periodontal ligament stem cells* (células madre de ligamento periodontal).

Es posible aislar células madre de la pulpa a partir de dientes deciduos cuya plasticidad es mayor que la de pulpa de diente permanente, debido a estar teóricamente más indiferenciada. Estas células poseen capacidad para diferenciarse al linaje osteoblástico, adiposo y neural. Su perfil inmunofenotípico, expresa marcadores neurales previos a su diferenciación, fruto del rol tan importante que tienen las células de la cresta neural en la odontogénesis. Tras su inducción al linaje neural, con un medio inductor neurogénico durante 4 semanas, aumenta la expresión de GFAP, β-III tubulina y GAD. Cuando se trasplantan en ratones inmunodeprimidos forman hueso, regeneran dentina y son capaces de sobrevivir en el cerebro de ratón y expresar marcadores neurales. Sin embargo, en experimentos *in vivo* no son capaces de regenerar el complejo dentino-pulpar completo como las DPSCs (207).

Otra fuente de células madre del diente es el folículo dental (**DFSCs**, por sus siglas en inglés), saco de tejido conectivo que envuelve al diente no erupcionado. Este folículo dará lugar al ligamento periodontal (**PDL**, por sus siglas en inglés). De tal modo que originará los fibroblastos del ligamento que rodea el diente, con capacidad de diferenciarse a odontoblastos, cementoblastos y osteoblastos (208). Debido a su condición de vestigio embrionario estas células expresan Nestina y Notch-1. Tras su diferenciación con dexametasona aparecen depósitos de calcio que se evidencian con Alizarín Red. *In vivo* son capaces de expresar la proteína osteocalcina y sialoproteina ósea tras un mes de trasplante en ratón inmunodeprimido, pero no de formar hueso o cemento. Estudios más recientes avalan su diferenciación *in vitro* a osteoblastos/cementoblastos, adipocitos y neuronas (208–211).

Recientemente se ha demostrado la presencia de células madre en la papila apical, tejido derivado del ectomesénquima, que inducido por la lámina dental, tiene como función el desarrollo de las raíces durante la odontogénesis (212). Estas células madre de la papila apical también han demostrado potencial dentinogénico, adipogénico y neurogénico cuando son tratadas con los respectivos estímulos. Al comparar las propiedades de las células madre de

la papila apical con DPSCs, se observó que las primeras, obtenidas del mismo diente y cultivadas con las mismas condiciones, mostraron mayor tasa de proliferación, mayor capacidad de regeneración tisular y mayor número de células STRO-1 positivas, es decir, mayor capacidad clonogénica. Además, las células madre de la papila apical expresan un nivel más alto de supervivencia, pues tienen una tasa de apoptosis menor y son positivas para telomerasa, lo cual significa que tienen una tasa de duplicación mayor (212–214).

Por su importancia en este trabajo se desarrollará un apartado dedicado a las células madre de ligamento periodontal.

1.4.3. CÉLULAS MADRE DE LIGAMENTO PERIODONTAL

En el PDL, tejido que envuelve la raíz, se encuentran las células madre de ligamento periodontal (**PDLSCs**, por sus siglas en inglés), unas células mesenquimales indiferenciadas que fueron descritas en 2004 (215). Las PDLSCs se definen por ser clonogénicas, tener una proliferación alta y capacidad de regenerar tejido periodontal (216).

In vitro, las PDLSCs tienen la capacidad de diferenciarse a múltiples linajes como células similares a osteoblastos y cementoblastos, adipocitos, y células formadoras de colágeno (215–217), aunque los resultados de algunos trabajos revelaron que su potencial osteogénico era más bajo que en tejidos homólogos de médula ósea y tejido pulpar (215,216). Se ha publicado que las PDLSCs se pueden diferenciar a células similares a condrocitos en medios de inducción condrogénicos con la adición de TGF-β3 (216) y BMP6 al medio de cultivo (218).

Las PDLSCs se han aislado a partir de tejido periodontal inflamado obtenido de defectos intraóseos durante la cirugía de colgajo, mostrando propiedades similares en proliferación y diferenciación, un aumento de la capacidad migratoria, y una capacidad de diferenciación osteoblástica menor en comparación con PDLSCs sanas (219,220). Las células madre aisladas de

tejido periodontal afectado de periodontitis incluso muestran diferenciación a precursores neuronales altamente proliferativos *in vitro* (221).

Varios autores han investigado las diferencias entre PDLSCs aislados de piezas permanentes o deciduas, encontrando que las PDLSCs procedentes de dientes de leche tienen una mayor tasa de proliferación (222,223) aunque los dos tipos de células muestran multipotencialidad hacia adipocitos, osteoblastos y condrocitos con algunas diferencias entre ellas en el potencial de diferenciación (224). En la capacidad de diferenciación adipogénica entre deciduos y definitivos hay resultados contradictorios. Silvério y col. obtuvieron que las PDLSCs deciduas tienen una mayor capacidad para diferenciarse a células similares a adipocitos que a células similares a osteoblastos, al compararlas con PDLSCs permanentes (223). Por el contrario, Ji y col. informaron que las PDLSCs deciduas son más aptas que las permanentes para diferenciarse tanto a osteoblastos como a adipocitos bajo las adecuadas condiciones de diferenciación *in vitro* (222).

También se han publicado varios estudios en los que se han aislado y caracterizado las células madre y las subpoblaciones de células progenitoras en el PDL de diferentes especies animales (225–227).

El factor de crecimiento FGF-2 se ha descrito como estimulador de la proliferación de las PDLSCs humanas (**hPDLSCs**) en cultivo (228). Por otra parte se ha demostrado que el TGF-β1 combinado con PDGF-BB y IGF-1 estimulan la mitogénesis y mejoran la adhesión de las hPDLSCs a fragmentos de raíz humana con enfermedad periodontal tratados por raspado y acondiciondo la raíz con una solución de ácido cítrico y tetraciclina (229). Las PDLSCs porcinas son inducidas por BMP-2 para formar nódulos mineralizados y por FGF-2 para formar estructuras vasculares en forma de tubo (227).

Se han realizado varios estudios *in vivo* en modelos animales. Las hPDLSCs mezcladas con partículas cerámicas formadas por HA y fosfato tricálcico (TCP, por sus siglas en inglés), cuando son trasplantadas en defectos periodontales, en el área molar de la mandíbula de ratas

inmunocomprometidas, han demostrado ser capaces de generar un complejo similar al cemento de PDL, caracterizado por una capa de tejidos tipo cemento alineados y claramente asociados a tejidos tipo PDL (215). Los resultados obtenidos por Choi y col. mostraron que las hPDLSCs procedentes de PDL humano sano e inflamado mezclado con fosfato cálcico bifásico macroporoso crean una típica estructura de cemento similar al PDL de ratones inmunodeprimidos después del trasplante, aunque el grado de regeneración de cemento inducido fue significativamente menor en las hPDLSCs inflamadas que en las sanas (230). En experimentos *in vivo* que comparaban hPDLSCs deciduas y definitivas se observó que láminas de hPDLSCs procedentes de dientes de leche combinados con bloques de dentina trasplantados en la cavidad peritoneal de ratones desnudos fueron capaces de generar tejido fibroso tipo PDL dispuesto regularmente en la superficie del bloque de dentina. Por el contrario, en las células definitivas, sólo hubo regeneración de los tejidos similares a PDL, pero no formación de cemento (222).

Las PDLSCs obtenidas en perros, cuando se siembrar en un *scaffold* de HA y son trasplantadas en ratones inmunocomprometidos, generan un complejo similar al cemento producido por LPD (225). Se logran los mismos resultados si se aplica en defectos de furcación en perro usando *scaffolds* de colágeno (231). Además, se ha descrito que las PDLSCs de perro promueven la regeneración ósea al mezclarse con portadores de HA/TCP en defectos en silla de montar peri-implante creados quirúrgicamente (232).

En el caso de las esponjas de gelatina, la siembra de PDLSCs de rata sobre este material ha logrado promover la formación de hueso, PDL y cemento *in vivo* (233).

El conjunto de estos logros es muy importantes en relación a la terapia de regeneración del tejido destruido por la enfermedad periodontal, una de las principales causas de la pérdida de piezas dentales (234).

La revisión realizada por Bossù y col., propone las hPDLSCs como los tipos celulares más adecuados en la regeneración periodontal y ósea para las

posibles aplicaciones clínicas en el campo de las células madre y la ingeniería de tejidos (206).

2. OBJETIVOS

La elaboración de biomateriales híbridos supone el siguiente paso tras el descubrimiento de un biomaterial determinado e implica una optimización de sus propiedades y, por consiguiente, sus potenciales aplicaciones mediante la combinación con otros compuestos cuyas características sean sinérgicas, dando lugar así a materiales más adecuados según el tipo de tejido que se pretenda regenerar.

El óxido de grafeno y la fibroína de seda son biomateriales prometedores para la ingeniería de tejidos gracias a que en ambos se han descrito excelentes resultados de biocompatibilidad. En la aplicación clínica de estos materiales, la biocompatibilidad de los *scaffolds* es un prerrequisito (152). En odontología regenerativa, la terapia basada en células madre adultas requiere con frecuencia un *scaffold* donde colocar células o factores de crecimiento en el lugar de la lesión. Con el fin de evaluar un *film* compuesto de fibroína y GO como *scaffold* 2D, nuestro grupo de investigación empleó hPDLSCs como modelo celular obteniendo resultados esperanzadores en términos de adhesión, viabilidad, proliferación y mantenimiento de fenotipo mesenquimal (184).

Como continuación a la línea de trabajo anteriormente expuesta, el objetivo fundamental que motiva la realización de esta tesis doctoral es la búsqueda de un biomaterial híbrido basado en grafeno y fibroína en una adecuada proporción de ambos, sobre el que las hPDLSCs muestren buenos resultados de adhesión, viabilidad, proliferación y/o diferenciación hacia diversos tipos celulares. Para alcanzarlo, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- **Objetivo 1:** Elaboración y caracterización de *films* compuestos por grafeno y fibroína con distintas configuraciones y composiciones, con el fin de optimizar sus propiedades y potenciales aplicaciones en ingeniería de tejidos.

- **Objetivo 2:** Evaluación *in vitro* de la morfología, proliferación, viabilidad y perfil mesenquimal de las hPDLSCs sobre los *films* elaborados, como puntos fundamentales en la optimización de este biomaterial híbrido.

- **Objetivo 3:** Estudio de la capacidad inductora de diferenciación hacia osteoblastos, condroblastos o cementoblastos de los distintos materiales analizados en cultivos de hPDLSCs.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. CÉLULAS MADRE HUMANAS DE LIGAMENTO PERIODONTAL

3.1.1. AISLAMIENTO CELULAR

Las extracciones dentales se realizaron en la Unidad de Cirugía Oral y Maxilofacial del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia). Se recogieron dientes definitivos (n=200 dientes) de pacientes mayores de 14 años. Para asegurar el anonimato de los donantes no se llevó a cabo la identificación de los dientes recogidos.

Inmediatamente tras la extracción, los dientes recogidos se depositaron en tubos de 50 ml con 25 ml de medio de cultivo celular compuesto por:

- *Minimum Essential Medium Eagle* (MEM, SIGMA)
- Mezcla de antibióticos (100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina; SIGMA)
- Antifúngicos (250 U/ml de anfotericina B; SIGMA).

Las muestras se conservaron entre 4 ˚C y 8 ˚C durante un máximo de 72 horas desde la extracción hasta poder ser procesadas.

Extracción del Ligamento Periodontal Humano (hPDL)

Se trabajó en condiciones de esterilidad en una cabina de seguridad biológica vertical tipo II con filtro HEPA.

- Los dientes recogidos se colocaron en una placa de Petri con PBS estéril (tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4) y una mezcla de antibióticos (100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina; SIGMA) y antifúngicos (250 U/ml de anfotericina B; SIGMA).
- A continuación, el ligamento periodontal se retiró cuidadosamente de la superficie de la raíz de los dientes, fundamentalmente del tercio medio, con la ayuda de unas pinzas y un bisturí (hoja nº 15).
- El ligamento periodontal y la pulpa dental (junto con el PBS) se traspasaron por separado a un tubo (Falcon) donde se centrifugó

durante 10 minutos a 1000 rpm. Se desechó el sobrenadante y se procedió a realizar la disgregación enzimática y mecánica.

Disgregación enzimática:

1. El precipitado celular fue sometido a una disgregación enzimática utilizando una disolución de proteasas: colagenasa I (3mg/ml; Worthington Biochem) y dispasa II (4mg/ml; GIBCO) durante 1 hora a 37 ˚C.
2. Las proteasas se inactivaron añadiendo un volumen igual de medio de cultivo celular MEM muy frío.
3. Se centrifugó durante 10 minutos a 1000 rpm.
4. Tras desechar el sobrenadante, se resuspendió el precipitado celular en medio de cultivo MEM con anfotericina B (250 U/ml).
5. Se centrifugó durante 10 minutos a 1000 rpm.
6. Tras desechar el sobrenadante, se añadió medio de cultivo celular MEM con anfotericina B (250 U/ml).

Disgregación mecánica:

1. Con el fin de quitar los trozos más grandes de tejido remanente, se recogieron las células del tubo con una pipeta Pasteur y se depositaron sobre una malla estéril de 100 µm (Falcon, BD), donde se tamizaron a través de la misma mediante la adición de medio de cultivo MEM.
2. La solución resultante se centrifugó durante 10 minutos a 1000 rpm.
3. Posteriormente, se desechó el sobrenadante y se añadió medio de cultivo celular MEM en el que se resuspendieron las células.

3.1.2. CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS DE LIGAMENTO PERIODONTAL

Las células en suspensión se cultivaron en un frasco de cultivo de 25 cm^2 (Sarstedt) y se incubaron en las siguientes condiciones: 37 ºC, 5% de CO_2 y 95% de humedad. Las células aisladas del ligamento periodontal crecen adheridas al plástico de la placa de cultivo. Para el cultivo primario de células de ligamento periodontal, su expansión y mantenimiento, se utilizó un medio de

cultivo celular que fue denominado medio basal (MB). El medio basal estaba compuesto por α-MEM (*Minimum Essential Medium Eagle*, *Alpha Modification*, SIGMA) al que se le añadieron los siguientes componentes:

COMPONENTES	CONCENTRACIÓN
FBS (Gibco)	15%
P/S (Sigma)	100 µg/ml
Glutamina (Sigma)	2 mmol/l
Ácido ascórbico 2 fosfato (Sigma)	100 µg/ml
Anfotericina B (Sigma)	2,5 µg/ml

Con el objetivo de conseguir un número de células suficientes para llevar a cabo la investigación, semanalmente, cuando las células estaban cerca de llegar al estadio de confluencia, ocupando aproximadamente el 85% de la base del frasco de cultivo, se realizaba el subcultivo, que incluye los procesos de tripsinización y siembra.

Para llevar a cabo la tripsinización se procedía del siguiente modo:

1. Se retiró el medio de cultivo del frasco que contenían las células.
2. Se lavó con PBS 1X y se retiró.
3. Se añadió tripsina 0.25% + EDTA 1mM (disgregación enzimática) en cantidad suficiente para cubrir la superficie del mismo.
4. Se incubó en una estufa para cultivos celulares a 37 ºC, 5% de CO_2 y 95% de humedad durante 4 minutos.
5. Se neutralizó la actividad enzimática con igual o mayor cantidad de medio de cultivo completo frío.
6. Se centrifugó durante 10 minutos a 1000 rpm y se desechó el sobrenadante.
7. Por último, se resuspendieron las células las células en 1 ml de medio de cultivo basal para su posterior recuento y viabilidad celular.

3.1.3. RECUENTO Y ESTIMACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

Antes de realizar el subcultivo de las células tripsinizadas, se hizo un recuento y estimación de la viabilidad celular mediante la utilización del lector automático *TC20^{TM} Automatic Cell Counter*de BioRad y azul tripán (se disponía de una cámara de Neubauer o hemocitómetro en caso de avería del dispositivo automático). Este método se basa en que la membrana citoplasmática de las células vivas (viables) no permite la entrada del colorante azul tripán, permaneciendo refringentes, mientras que la membrana de las células muertas (no viables), que han perdido su integridad, permite el paso del colorante tiñéndolas de azul.

Los pasos a seguir fueron los siguientes:

- La suspensión celular se agitó y se depositaron 15 µl de la misma en un tubo de 1,5 ml al que se le añadieron otros 15 µl de una solución al 0,4% de azul tripán (1:1).
- La homogeneidad de la muestra se aseguró agitándola suavemente con una micropipeta y evitando la formación de burbujas.
- De esta mezcla, se dispensaron 15 µl en una de las dos cámaras del portaobjetos para recuento.

Tras estimar la viabilidad, se ajustó el número de células de la suspensión anterior para sembrarlas, generalmente en frascos de cultivo de 75 cm^2, a una densidad de 6000 células/cm^2. Las células se incubaron en una estufa para cultivos celulares a 37 ºC, 5% de CO_2 y 95% de humedad. El medio de cultivo celular basal se cambiaba con una frecuencia de 2-3 veces por semana.

3.2. BIOMATERIALES

El interés de combinar la SF y el GO radica en el carácter bidimensional del grafeno y las limitaciones que esta característica otorga al material a la hora de hacerlo implantable. Este aspecto, la tridimensionalidad, es el que le proporciona la fibroína al grafeno al combinarlos. Además, favorecería que las células puedan permanecer en el lugar deseado actuando como material biocompatible que da soporte al grafeno (15,184).

3.2.1. PROCESADO DE LA SEDA

Los capullos de *Bombyx mori* fueron obtenidos de gusanos de seda criados en las instalaciones del IMIDA (Murcia, España). Para la eliminación de la sericina los capullos fueron troceados y se hirvieron durante 30 minutos en una disolución 0,02N de Na_2CO_3 (Panreac, España). Seguidamente, se hizo un lavado a la malla resultante con agua destilada para extraer la sericina remanente. Una vez secada a temperatura ambiente (durante 3 días), la fibroína (SF) se disolvió en LiBr 9,3 M (Acros Organics, Bélgica) al 20% (p/v) durante 3 horas a 60 ºC. Posteriormente, se llevó a cabo un proceso de diálisis frente a agua destilada durante 3 días (realizando un total de 8 cambios de agua) para eliminar el LiBr, seguido de un filtrado con papel Miracloth (Calbiochem, Alemania). Como resultado de este protocolo se obtuvo una disolución de SF acuosa regenerada al 7% p/v, que fue conservada a 4 ºC hasta su utilización, durante no más de un mes. Esta disolución fue empleada como material de partida para la elaboración de los biomateriales estudiados en la presente tesis doctoral, con combinación con el GO.

3.2.2. ELABORACIÓN Y COMPOSICIÓN DE LOS BIOMATERIALES

El suministro de óxido de grafeno (suspensión acuosa a 4 mg/mL) corrió a cargo de la empresa GRAPHENEA (San Sebastian, España). Se utilizaron placas de 48 pocillos para cultivo de tejidos (Nunclon^{TM}) para preparar *films* con diferente composición: óxido de grafeno (GO), óxido de grafeno reducido

(rGO), SF y SF combinada con GO o rGO en diferentes proporciones y configuraciones, tal y como se describe más adelante. Tras la colocación de los materiales en las placas multipocillo, éstas fueron esterilizadas por inmersión en etanol 70% v/v durante 10 minutos. Por último, se realizaron dos lavados con PBS 1X antes de sembrar las células.

La distribución de los materiales mantuvo un orden concreto, fijando una misma composición a lo largo de toda una columna. En todas la placas, la primera columna se dejó sin material (plástico propio de la placa) con el fin de utilizarlo como control positivo del crecimiento celular. En las Tablas 2 y 3 y la Figura 18 se especifica e ilustra la distribución de los materiales.

Se generaron dos tipos de placas en función del estado de oxidación del óxido del grafeno:

- **Placas oxidadas:** Materiales con óxido de grafeno (**GO**, por sus siglas en inglés *graphene oxide*).
- **Placas reducidas:** Materiales con óxido de grafeno reducido (**rGO**, por sus siglas en inglés *reduced graphene oxide*) con ácido ascórbico a 70 ºC durante 3 horas.

Descripción de la combinación de materiales en las placas

La elaboración de los materiales se llevó a cabo empleando diferentes disposiciones y proporciones. La composición de los *films* en cada pocillo se detalla a continuación:

- *Films* de GO: 1 mg de GO.
- *Films* de SF: 3 mg SF.
- *Films* de GO:SF (3:1): 3 mg de GO y 1 mg de SF.
- *Films* de GO:SF (1:1): 2 mg de GO y 2 mg de SF.
- *Films* de GO:SF (1:3): 1 mg de GO y 3 mg de SF.
- *Films* de GO/SF: bicapa con GO (1 mg) en la capa superior y SF (3 mg) en la inferior.
- *Films* de SF/GO: bicapa con SF (3 mg) en la parte superior y GO (1 mg) en la inferior.

Para la obtención de los *films* puros de GO se emplearon, 250 µl/pocillo de una suspensión acuosa de este compuesto (4 mg/mL), que simplemente se dejo secar a temperatura ambiente durante 24 h y para los de fibroína pura se utilizaron 133 µl de SF acuosa al 1,5%, preparada tras diluir la disolución original al 7% p/v.

Los *films* constituídos por una mezcla de GO y SF en distintas proporciones (3:1, 1:1 y 1:3) se elaboraron a partir de la suspensión y disolución de los materiales puros, respectivamente, combinando los volúmenes adecuados de GO y SF para garantizar la composición previamente descrita, tras su secado e insolubilización.

La disposición de los materiales en bicapa debía realizarse en dos fases. En la bicapa GO/SF se realizó una primera fase en la que se generaba un *film* de SF en la base mediante secado de la disolución de fibroína e insolubilización de la misma mediante cristalización en vacio con alta humedad relativa y una segunda fase en la que se añadía en la parte superior la solución de GO para crear la superficie bioactiva del grafeno, tras la evaporación del agua. En la bicapa SF/GO, primero se dispuso la solución de GO en la base y, tras su evaporación, se añadió la solución de SF, que una vez más se secó a temperatura ambiente y se cristalizó en condiciones de vacío y alta humedad relativa durante 24 h.

En todos los materiales que incluyeron fibroína en su composición se requirió un paso de insolubilización de la misma, para así garantizar su integridad estructural durante los ensayos de cultivo *in Vitro.* Este procedimiento se llevo a cabo mediante la aplicación a los composites de un vacio de 800 mBares durante 24 h, ubicándolos en cámaras con alta humedad relativa, produciéndose de forma efectiva la transición de seda I (hidrosoluble) a seda II (con mayor contenido en lámina β e insoluble en medios acuosos).

Con el fin de favorecer la adhesión de las células a los materiales, las placas eran tratadas con suero bovino fetal (120 µl/pocillo) a 37 ºC durante 1 hora, previamente a la siembra.

plástico	GO	GO:SF(3:1)	GO:SF(1:1)	GO:SF(1:3)	SF	GO/SF	SF/GO
plástico	GO	GO:SF(3:1)	GO:SF(1:1)	GO:SF(1:3)	SF	GO/SF	SF/GO
plástico	GO	GO:SF(3:1)	GO:SF(1:1)	GO:SF(1:3)	SF	GO/SF	SF/GO
plástico	GO	GO:SF(3:1)	GO:SF(1:1)	GO:SF(1:3)	SF	GO/SF	SF/GO
plástico	GO	GO:SF(3:1)	GO:SF(1:1)	GO:SF(1:3)	SF	GO/SF	SF/GO
plástico	GO	GO:SF(3:1)	GO:SF(1:1)	GO:SF(1:3)	SF	GO/SF	SF/GO

Tabla 2. Disposición de los *films* en la placa oxidada.

En las placas en las que el GO se sometió a reducción por ácido ascórbico (235), el grafeno se representó como **rGO** y la fibroína como **rSF**.

plástico	rGO	rGO:rSF(3:1)	rGO:rSF(1:1)	rGO:rSF(1:3)	rSF	rGO/rSF	rSF/rGO
plástico	rGO	rGO:rSF(3:1)	rGO:rSF(1:1)	rGO:rSF(1:3)	rSF	rGO/rSF	rSF/rGO
plástico	rGO	rGO:rSF(3:1)	rGO:rSF(1:1)	rGO:rSF(1:3)	rSF	rGO/rSF	rSF/rGO
plástico	rGO	rGO:rSF(3:1)	rGO:rSF(1:1)	rGO:rSF(1:3)	rSF	rGO/rSF	rSF/rGO
plástico	rGO	rGO:rSF(3:1)	rGO:rSF(1:1)	rGO:rSF(1:3)	rSF	rGO/rSF	rSF/rGO
plástico	rGO	rGO:rSF(3:1)	rGO:rSF(1:1)	rGO:rSF(1:3)	rSF	rGO/rSF	rSF/rGO

Tabla 3. Disposición de los *films* en la placa reducida.

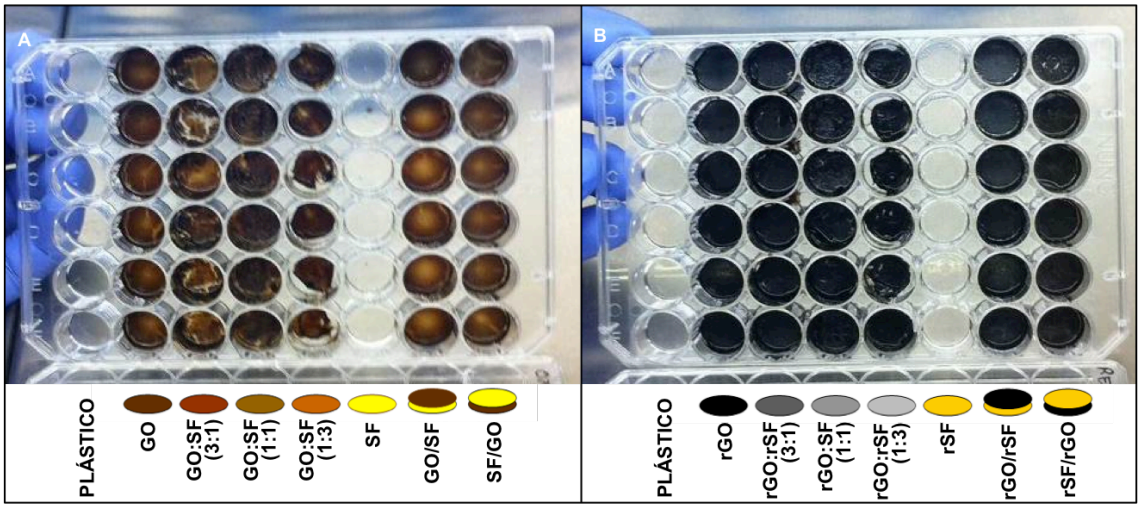

Figura 18. Aspecto de las placas oxidada (A) y reducida (B) y esquema ilustrativo en el que se identifica el orden de los *films*.

3.3. ANÁLISIS TOPOGRÁFICO DE LOS BIOMATERIALES Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS hPDLSCs POR MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)

Debido a las particularidades de esta técnica, en este caso los materiales no se dispusieron en placas de 48 pocillos, sino en placas de paredes desmontables de 4 pocillos con una superficie de 2 cm^2 cada uno, para facilitar su manipulación y posterior montaje en los pedestales empleados para el recubrimiento con oro necesario en MEB.

Las células se sembraron a una densidad de 7000 células/cm^2 en un volumen total de 800 µl de medio de cultivo DMEM. Del mismo modo que las placas multipocillo, éstas fueron tratadas, previamente a la siembra, con 200 µl de SBF durante 1 hora para favorecer la adhesión celular.

Para la realización de este ensayo se procedió del siguiente modo:

1. Se sembraron 14.000 células por pocillo en 800 µl de medio de cultivo DMEM con rojo fenol suplementado con L-glutamina (2 mM/ml), 10% de SBF y penicilina/estreptomicina (100 µg/ml).
2. Se incubaron a 37 ºC y CO_2 al 5% durante 10 días.
3. Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a la fijación de las células en cultivo para su posterior procesado en el Servicio de Microscopía del SAI (Servicio de Apoyo a la Investigación) de la Universidad de Murcia, aplicándoles el siguiente protocolo:
   a) Fijación con glutaraldehído al 3% en tampón cacodilato sódico 0,1M durante 45-60 min, incubando a 4ºC.
   b) Adición de tampón lavador cacodilato sódico 0,1M y sacarosa al 8%.
   c) Fijación, posteriormente, en tetraóxido de osmio al 1% durante 1-2 horas.
   d) Lavado con tampón cacodilato sódico 0,1M y sacarosa al 8% (24 horas).
   e) Deshidratación de las muestras con concentraciones crecientes de acetona hasta acetona 100% durante 10 minutos (30%, 50%, 70%, 90% y 100%).

f) Secado mediante la técnica de punto crítico con acetona 100% y CO_2 líquido.
g) Finalmente, se realizó un recubrimiento con oro con el metalizador *BIO-RAD Polaron Division* (200A) (Fig. 19).

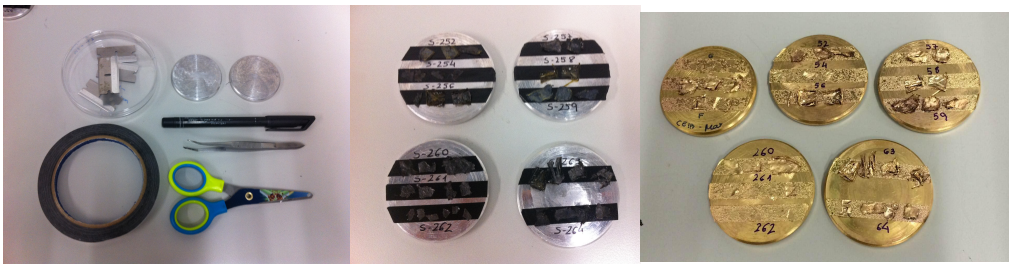

Figura 19. Materiales utilizados en la etapa de recubrimiento con oro.

Tanto las muestras destinadas al análisis topográfico de los materiales como las sembradas con hPDLSCs se observaron al microscopio electrónico de barrido Jeol 6100 y las imágenes se captaron a través del *software INCA X-stream and mics* de *Oxford Instruments Analytical*.

La captación de imágenes en cada uno de los biomateriales se realizó a 200X, 1.000X y 10.000X. Éstas se obtuvieron por triplicado en cada aumento y fueron tomadas de campos aleatoriamente seleccionados para garantizar la representatividad fidedigna de la topografía de los materiales y la morfología celular. Para estudiar la topografía y nanotopografía de los *films* no celularizados se fijaron los aumentos 1.000X y 10.000X respectivamente. Para el análisis morfológico de las hPDLSCs en los *films* celularizados se captaron imágenes a 200X.

3.4. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN MEDIANTE MTT

El ensayo MTT (desarrollado por Mosmann en 1983 y modificado por Francois Denizot y Rita Lang en 1986) se realizó para medir la proliferación de las células de ligamento periodontal. Esta prueba permite determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas a través de la reducción metabólica que realiza la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa sobre el sustrato bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Como resultado se genera formazán, un compuesto de color azul cuya cantidad generada es proporcional a la cantidad de células vivas en cultivo.

Para la realización de este ensayo se procedió del siguiente modo:

1. Se sembraron 7000 células por pocillo en 400 µl de medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium, Thermo Físher Scientific*) con rojo fenol suplementado con L-glutamina (2 mM/ml), 10% de SBF y penicilina/estreptomicina (100 µg/ml).
2. Se incubaron a 37 ºC y CO_2 al 5% durante los tres tiempos establecidos: 4, 7 y 10 días.
3. Transcurrido el tiempo de incubación (4, 7 ó 10 días), se sustituyó el DMEM con rojo fenol por 400 µl de DMEM sin rojo fenol.
4. El reactivo MTT se añadía a cada uno de los pocillos para quedar a una concentración final de 3,8 mg/ml y se incubó a 37 ºC y un 5% de CO_2 durante 4 horas.
5. Tras la incubación, se retiró el contenido de los pocillos y se añadieron 400 µl de DMSO por pocillo.
6. Se trasvasaron 200 µl del contenido de cada pocillo a una placa de lectura y se midió la absorbancia a 570 nm con medida de referencia a 690 nm.

En todos los casos, los experimentos se realizaron por quintuplicado para garantizar una representatividad estadística suficiente en los datos obtenidos.

3.4.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los datos se empleó el programa SPSS 19.0 para Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). La significancia estadística para los datos de proliferación celular se determinó empleando un contraste *post-hoc* mediante el test T3 de Dunnett, que permite realizar una comparación múltiple no asumiendo varianzas iguales en muestras con una distribución normal. La significación estadística se aceptó para valores de $p<0,05$.

3.5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE SUPERFICIE DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES POR CITOMETRÍA DE FLUJO

La expresión de moléculas de superficie de células madre mesenquimales se realizó en pases 2-4 de cultivos de hPDLSCs utilizando la técnica de citometría de flujo.

Las células se sembraron a una densidad de 7000 células/cm^2 en placas de cultivo multipocillo de 48 posiciones con la disposición de los biomateriales anteriormente detallada, incubándose durante 10 días a 37ºC, en medio de cultivo completo DMEM. Una vez cumplido el periodo de incubación, se les aplicó el siguiente protocolo:

- Las células se separaron de la superfice de cultivo empleando una solución de tripsina al 0.25% en EDTA 1mM.
- Se lavaron con PBS 1X.
- Se incubaron en oscuridad, a 4 ºC y durante 30 minutos con anticuerpos monoclonales específicos marcados con fluorescencia para CD73, CD90, y CD105 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania), recomendados por la Sociedad Internacional de Terapia celular (ISCT) para confirmar el fenotipo mesenquimal de la células. También se analizó la ausencia de expresión de marcadores hematopoyéticos (CD14, CD20, CD34 y CD45, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania)(236,237).

La fluorescencia no específica se midió utilizando anticuerpos monoclonales de isotipo específico. La fluorescencia celular se midió en el citómetro de flujo BD FACS Canto y los resultados se analizaron mediante el *software* Kaluza.

3.6. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

Las anexinas son una familia de proteínas de unión a fosfolípidos dependientes de calcio, que se emplean junto a tinciones vitales para identificar distintos estados apoptóticos mediante citometría de flujo. En el caso de la Anexina-V, ésta se une a fosfatidilserina (PS, por sus siglas en inglés *phosphatidylserine*). En células sanas, la PS se localiza en la cara citosólica se la membrana plasmática. Una vez iniciada la apoptosis, la PS pierde su distribución asimétrica y se transloca a la cara extracelular de la bicapa fosfolipídica, siendo así detectable mediante Anexina-V conjugada con ficoeritrina (**PE**, por sus siglas en iglés *phycoerythrin*). En estados tempranos de apoptosis, la membrana plasmática excluye tinciones vitales como la 7-amino-actinomiosiona (7-AAD), por lo que las células sólo son positivas para la tinción con Anexina-V. En estados tardíos de apoptosis, la pérdida de integridad de la membrana celular permite tanto la unión de la Anexina-V a PS citosólica, como la captación de 7-AAD.

Tras 10 días en cultivo sobre los diferentes biomateriales, las hPDLSCs fueron sometidas a una tinción doble con Anexina-V conjugada con PE y 7-AAD (BD Biosciences) para determinar la viabilidad celular mediante citometría de flujo. Para ello se siguieron los siguientes pasos:

- Las células se separaron de la superfice de cultivo empleando una solución de tripsina-EDTA al 0.25%
- Se lavaron con PBS 1X
- Se incubaron con Anexina-V conjugada con PE y 7-AAD en tampón de unión a temperatura ambiente durante 15 min.

El análisis de los resultados se realizó en el citómetro de flujo BD FACS Canto, interpretando los resultados (porcentaje) del siguiente modo:

- Células vivas: Anexina-V^-/7-AAD^-.
- Células en apoptosis temprana o tardía: $Anexina^+$/7-AAD^-.
- Células necróticas (Anexina-V^+/7-AAD^+).

Todas la determinaciones se realizaron por triplicado.

3.7. EXPRESIÓN GÉNICA

3.7.1. AISLAMIENTO DE RNA

Las hPDLSCs se sembraron en placas de cultivo de 48 pocillos por quintuplicado para cada tipo de material y estado de oxidación. Además, se prepararon un control negativo (plástico) y control positivo (Osteodiff® Miltenyi) para diferenciación osteogénica. El RNA total se aisló mediante el protocolo estandarizado de fenol-cloroformo utilizando el reactivo TRIzol® (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.) y el kit Mini miRNeasy (QIAGEN, Venlo, Limburgo, Países Bajos) según las instrucciones del fabricante.

El proceso de aislamiento de RNA siempre se hizo en hielo y campana extractora de gases. Se ejecutaron los siguientes pasos:

1. Se añadieron, a cada pocillo, 100 µl de TRIzol®.
2. Para favorecer la rotura de las membranas celulares, se pasó un raspador celular o *scraper* sobre el cultivo, presionando suavemente.
3. Se recogió el volumen de trizol+raspado correspondiente a los 5 pocillos del mismo tratamiento y se trasvasó a un tubo de 1,5 ml.
4. Se centrifugó a 1200 x g durante 10 minutos para separar el material insoluble procedente de los propios substratos o depósitos de calcio celulares, si los hubiere, y conservar el sobrenadante.
5. Se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Se añadieron 100 µl de cloroformo a los 500 µl de trizol y se agitaron vigorosamente durante 15 segundos.
7. A continuación, se incubaron 3 minutos a temperatura ambiente.
8. Se centrifugaron a 12000 x g durante 15 minutos 4 ºC y se recogió la fase acuosa (unos 300 µl).
9. Seguidamente, se añadieron 1,5 volúmenes de etanol 100%.
10. A partir de esta etapa, se inició el protocolo para aislamiento de RNA procedente de cultivos celulares recogido en el manual *RNeasy Mini Kit* de QIAGEN:
    - Paso 7 del manual referido. Pipetear 700 µl (o proporcional) de muestra, incluyendo cualquier precipitado, en un tubo de colección de 2 ml. Cerrar la tapa y centrifugar a ≥ 8000 x g

durante 15 segundos a temperatura ambiente. Repetir este paso si queda volumen de muestra.

- Se añadieron 700 µl de tampón RWT a la columna y se centrifugaron durante 15 segundos a 8000 x g.
- Se añadieron 500 µl de tampón RPE a la columna y centrifugaron durante 15 segundos a 8000 x g.
- Se añadieron otros 500 µl de tampón RPE a la columna y se centrifugaron durante 2 minutos a 8000 x g.
- La columna se transfirió a un nuevo tuvo de colección de 1,5 ml y se pipetearon 32 µl de agua libre de RNAsas directamente sobre la membrana de la columna. Se centrifugó durante 1 minuto a 8000 x g para la elución. De los 32 µl eluidos, 2 se emplearon en la cuantificación del RNA.

La cantidad y calidad del RNA aislado se midió mediante el espectrofotómetro UV de Thermo Scientific® Nanodrop 2000 (software de análisis: *Nanodrop 2000 Spectrophotometer*).

3.7.2. SÍNTESIS DE cDNA

El RNA total (0,1 a 0,25 mg) fue sometido a transcripción inversa y convertido en DNA copia (**cDNA**, por sus siglas en inglés) mediante el kit *miScript II RT* de QIAGEN (QIAGEN, Venlo, Limburgo, Países Bajos) en un termociclador durante 1 hora a 37 °C (*Techne TC-412*, Bibby Scientific, Stone, Staffordshire, Reino Unido). La síntesis de cDNA se hizo partiendo de 100 ng de RNA. La mezcla para un volumen de reacción se detalla en la Tabla 4.

	Volumen (µl)
5x miScript HiFlex	4
10x miScript Nuc Mix	2
Transcriptasa reversa	2
RNA/agua (RNA total 0,5 µg)	12
Volumen final	**20**

Tabla 4. Mezcla de reactivos para un volumen de reacción.

3.7.3. PCR CUANTITATIVA Y GENES SELECCIONADOS

La PCR cuantitativa, *qPCR Downstream* (*Kit miScript SYBR Green PCR*, *QIAGEN*, Venlo, Limburgo, Países Bajos), se realizó utilizando cebadores *QuantiTect*® (*Qiagen*, Venlo, Limburgo, Países Bajos) en un termociclador LC480 Luz (*Roche Diagnostic*®, Basilea, Suiza) de acuerdo con recomendaciones del fabricante.

Las muestras de cDNA se dispusieron en placas multipocillo de 360 posiciones y se amplificaron en el equipo de Roche, *LightCycler® 480*. La mezcla para un volumen de reacción se detalla en la Tabla 5. Se incluyeron triplicados técnicos para cada muestra y gen ensayado. El factor de cambio de la expresión génica se evaluó por el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. El CT es el número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de fluorescencia significativo con respecto a la señal de base, y es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas molde. El factor de cambio asume que la diferencia en el valor del CT entre dos muestras puede transformarse en cantidades relativas empleando la función exponencial en la que la eficiencia de la PCR actúa como base (238). Todas las comparaciones se relacionaron con el control negativo de células creciendo en plástico.

	Volumen (µl)
SYBR green	2,5
Pareja de cebadores	0,5
agua	1,5
cDNA	0,5
Volumen final	**5**

Tabla 5. Mezcla de reactivos para un volumen de reacción.

Se seleccionaron diferentes genes según codificaran factores específicos de transcripción osteo/condroblástica, proteínas relacionadas con osteoblastos o proteínas relacionadas con cementogénesis. Para la selección del gen de expresión constitutiva o *housekeeping* se tuvo en cuenta el trabajo

llevado a cabo por Ragni y col., seleccionando finalmente el gen GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) por encontrarse en una buena posición (3º) en el método *NormFinder* (239), además de estar disponible y haber sido utilizado previamente en el grupo de trabajo.

Genes que codifican factores específicos de transcripción osteo/condroblástica.

RUNX2

Nombre completo: *RUNT-RELATED TRANSCRIPTION FACTOR 2*.

Localización: Cromosoma 6.

Descripción

Este gen es un miembro de la familia de factores de transcripción RUNX, que codifica una proteína nuclear con un dominio Runt de unión a DNA. Esta proteína es esencial en la diferenciación osteoblástica y la morfogénesis del esqueleto y actúa como un andamiaje que controla la integración, organización y ensamblaje de ácidos nucleicos y factores de regulación implicados en la expresión de genes esqueléticos (240).

SOX9

Nombre completo: SRY (sex determining region Y)-box 9

Localización: Cromosoma 17.

Descripción

SOX9 es un factor de transcripción esencial en el desarrollo esquelético y el sexo. La proteína codificada por este gen reconoce la secuencia CCTTGAG junto con otros miembros de la clase HMG-box. Actúa durante la diferenciación a condrocitos y su deficiencia conduce a síndromes de malformación esquelética (241). Murakami y col. demostraron que la expresión de SOX9 está sobreexpresada por factores de crecimiento de fibroblastos en condrocitos primarios y en células mesenquimales (242).

SP7/OSX

Nombre completo: *SPECIFICITY PROTEIN 7 TRANSCRIPTION FACTOR/OSTERIX.*

Localización: Cromosoma 12.

Descripción

SP7/OSX es un factor de transcripción en dedo de cinc Cis_2-His_2 de la familia de genes SP y un supuesto regulador importante de la diferenciación osteogénica, que actúa aguas debajo de RUNX2 (243). Esta proteína es un factor de transcripción específico de hueso y es necesaria para la diferenciación osteoblástica y la formación de hueso (244).

Genes que codifican proteínas relacionadas con osteoblastos

BMP-2

Nombre completo: *BONE MORPHOGENETIC PROTEIN 2*

Localización: Cromosoma 20.

Descripción

La proteína codificada por este gen pertenece a la superfamilia del TGFβ (factor de crecimiento transformante beta). Actúa como un homodímero unido por puentes disulfuro e induce la formación de hueso y cartílago. Según el trabajo realizado por Cheng y col., BMP-2 fue de las pocas moléculas de la familia de proteínas morfogenéticas de hueso humanas capaz de inducir todos los marcadores de diferenciación osteoblástica en células madre pluripotenciales y mesenquimales (245).

ALP

Nombre completo: ALKALINE PHOSPHATASE, LIVER/BONE/KIDNEY (TISSUE NON-SPECIFIC)

Localización: Cromosoma 1.

Descripción

El producto de este gen es una enzima de membrana glicosilada inespecífica de tejido, cuya secuencia de aminoácidos consta de 524

residuos y se le atribuye un peso molecular de 57,2 kD (246). Participa en la hidrólisis de pirofosfato y su función se relaciona con la mineralización de la matriz extracelular, empleándose como marcador temprano de diferenciación osteogénica (247).

COL1A1

Nombre completo: COLLAGEN, TYPE I, ALPHA-1

Localización: Cromosoma 17.

Descripción

Este gen codifica la cadena pro-alfa1 de colágeno tipo 1, cuya triple hélice comprende dos cadenas alfa 1 y una cadena alfa 2. Aunque origina un polipéptidio largo (120 kD de peso molecular), el gen da lugar a un RNA mensajero monocistrónico (248). El colágeno tipo 1 se encuentra en la mayoría de tejidos conectivos y abunda en hueso, córnea, dermis y tendón. Su síntesis y ensamblaje juega un papel importante en la formación de la matriz extracelular durante la diferenciación osteo- y cementoblástica (249).

BGLAP/OC.

Nombre completo: *GAMMA-CARBOXYGLUTAMIC ACID PROTEIN/ OSTEOCALCIN, BONE.*

Localización: Cromosoma 1.

Descripción

Se trata de una pequeña molécula muy conservada, asociada a la matriz mineralizada del hueso. El gen codifica un propéptido que contiene 100 aminoácidos. El análisis de tejidos humanos mediante Northern blot ha detectado transcritos de OC de unas 450 pares de bases, con una fuerte expresión en médula ósea, y se ha observado que sólo los tejidos relacionados con hueso eliminan de forma eficiente los 3 intrones contenidos en el RNA (250). RUNX2 participa en el inicio de la transcripción de OC activando el promotor. La OC se encuentra entre las proteínas más abundantes de hueso y se produce exclusivamente en osteoblastos (251).

Genes relacionados con cementogénesis

PTPLA/CAP

Nombre completo: *PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE-LIKE MEMBER A/CEMENTUM ATTACHMENT PROTEIN.*

Localización: Cromosoma 10.

Descripción

PTPLA codifica una proteína de 287 aminoácidos y 33 kD de peso molecular, que pertenece a una familia de enzimas que cataliza la etapa de deshidratación de la síntesis de VLCFA (252). Recientemente, se ha descrito como una proteína específica de cemento cuya expresión génica está relacionada con la diferenciación temprana a cementoblastos (253,254).

CEMP1

Nombre completo: *CEMENTUM PROTEIN 1*

Localización: Cromosoma 16.

Descripción

Codifica para una proteína de 247 aminoácidos y 25,9 kD de peso molecular que contiene varios lugares de N-glicosilación, fosforilación y miristilación. Se han detectado transcritos de 5 kb mediante análisis de RT-PCR y Northern blot en cementoblastoma y hPDLSCs, pero no en células de hueso alveolar o fibroblastos gingivales. Mediante técnicas de hibridación *in situ* se ha descubierto que CEMP1 muestra un patrón de expresión muy definido y restringido a ligamento periodontal y células formadoras de cemento, así como en las células que revisten los vasos sanguíneos en el ligamento periodontal. Por otro lado, a través de estudios de inmunolocalización, se ha detectado la presencia de CEMP1 en el núcleo y citoplasma de células derivadas de cementoblastoma humano y hPDLSCs (255).

3.7.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los datos se empleó el programa SPSS 19.0 para Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). El cumplimiento del requisito de normalidad de los datos obtenidos se comprobó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov ($p>0,05$). La comparación de los grupos para las variables continuas normales se realizó mediante el test de la t de Student desapareada o el test U de Mann-Whitney, en caso de que no se cumpliese el requisito de normalidad (Kolmogorov-Smirnov, $p<0,05$).

Como la mayoría de las variables no tuvieron una distribución normal, se han representado mediante gráficos de cajas. La significancia estadística se aceptó para valores de $p<0,05$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CULTIVO DE hPDLSCs

Las células en suspensión aisladas del ligamento periodontal humano (**hPDL**, por sus siglas en inglés) se sembraron en frascos de cultivo de 25 cm^2. Dos días más tarde, las células se encontraban adheridas al fondo del frasco de cultivo (Fig. 20A) adoptando su típica morfología fusiforme típica, similar a la que presentan los fibroblastos en medio de cultivo estándar, tras cuatro días en cultivo (Fig. 20B) y mostraron la capacidad de formar colonias derivadas de células simples. Inicialmente, las hPDLSCs mostraron un fenotipo heterogéneo (Fig. 20C) que se transformó en homogéneo en los subcultivos siguientes, especialmente después del pase dos (Fig. 20D).

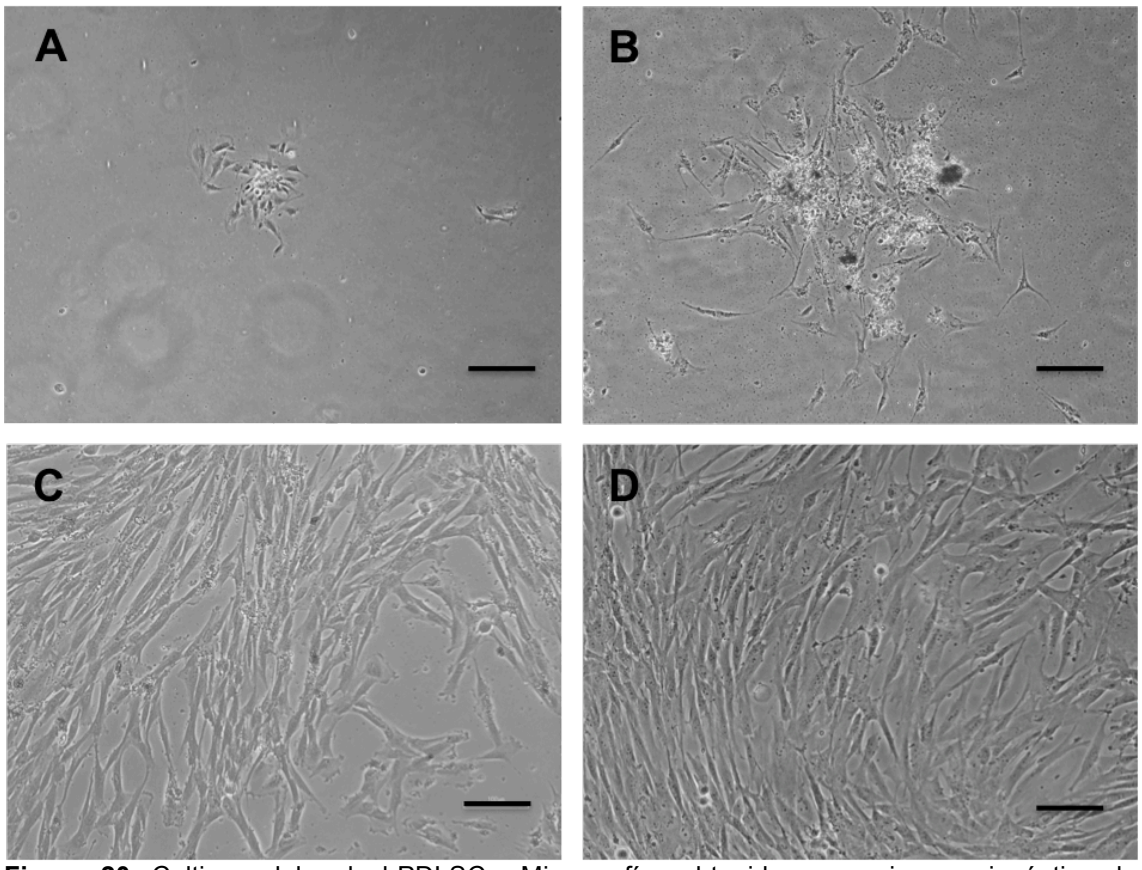

Figura 20. Cultivo celular de hPDLSCs. Micrografías obtenidas con microscopio óptico de campo claro. Imágenes de las células tras 2 (A), 4 (B) y 7 días (C) de cultivo. Subcultivo en pase 3 (D). Barra de escala: 100 µm.

4.2. ANÁLISIS DE LA TOPOGRAFÍA DE LOS *FILMS* BASADOS EN GRAFENO Y FIBROÍNA

En 2013, Hu y col. publicaron un trabajo en el que consiguieron constuir un *film* de óxido de grafeno y SF con una resistencia mecánica y dureza muy altas (256). Aunque la constitución de los *films* empleados en este trabajo no coincide exactamente con los construidos por Hu y col., durante la fase experimental de este trabajo, se observó que los *films* de GO y rGO se comportaban como materiales débiles y de difícil manejo, cuya consistencia mejoraba notablemente en las configuraciones en las que se encontraban mezclados con SF.

Tras visualizar mediante MEB los diferentes biomateriales, se observaron distintos grados de rugosidad, discontinuidades y huecos en la superficie de los *films*, aunque, en general, no se detectaron diferencias apreciables entre las versiones oxidada y reducida de materiales de la misma composición y configuración.

Los biomateriales puros, GO y rGO, se mostraron como una película ligeramente agrietada con repliegues en las discontinuidades (Fig. 21), mostrándose éstos más dispersos en la superficie reducida. Mientras, SF y rSF ofrecieron una apariencia prácticamente lisa, sin apenas imperfecciones (Fig. 21), lo que coincidió con las observaciones realizadas anteriormente por nuestro grupo (102).

En el caso de los biomateriales formados por distintas proporciones de fibroína y grafeno, las irregularidades de la superficie aumentaron con la cantidad de fibroína presente en los *films* en los que se mezclaron ambos biomateriales con diferentes proporciones. En las configuraciones donde la proporción de fibroína era menor, GO:SF(3:1) y rGO:rSF(3:1), se encontraron escasas grietas y pliegues poco profundos (Fig. 22). Al aumentar la cantidad de fibroína, la proporción 1:1 reveló una superficie rugosa y discontinuidades de distintas longitudes (Fig. 22). La relación 1:3, donde dominaba la proporción de fibroína, adoptó la imagen de varias películas agrietadas y replegadas en

diferentes profundidades, coincidiendo con el aspecto presentado en el trabajo anterior (102).

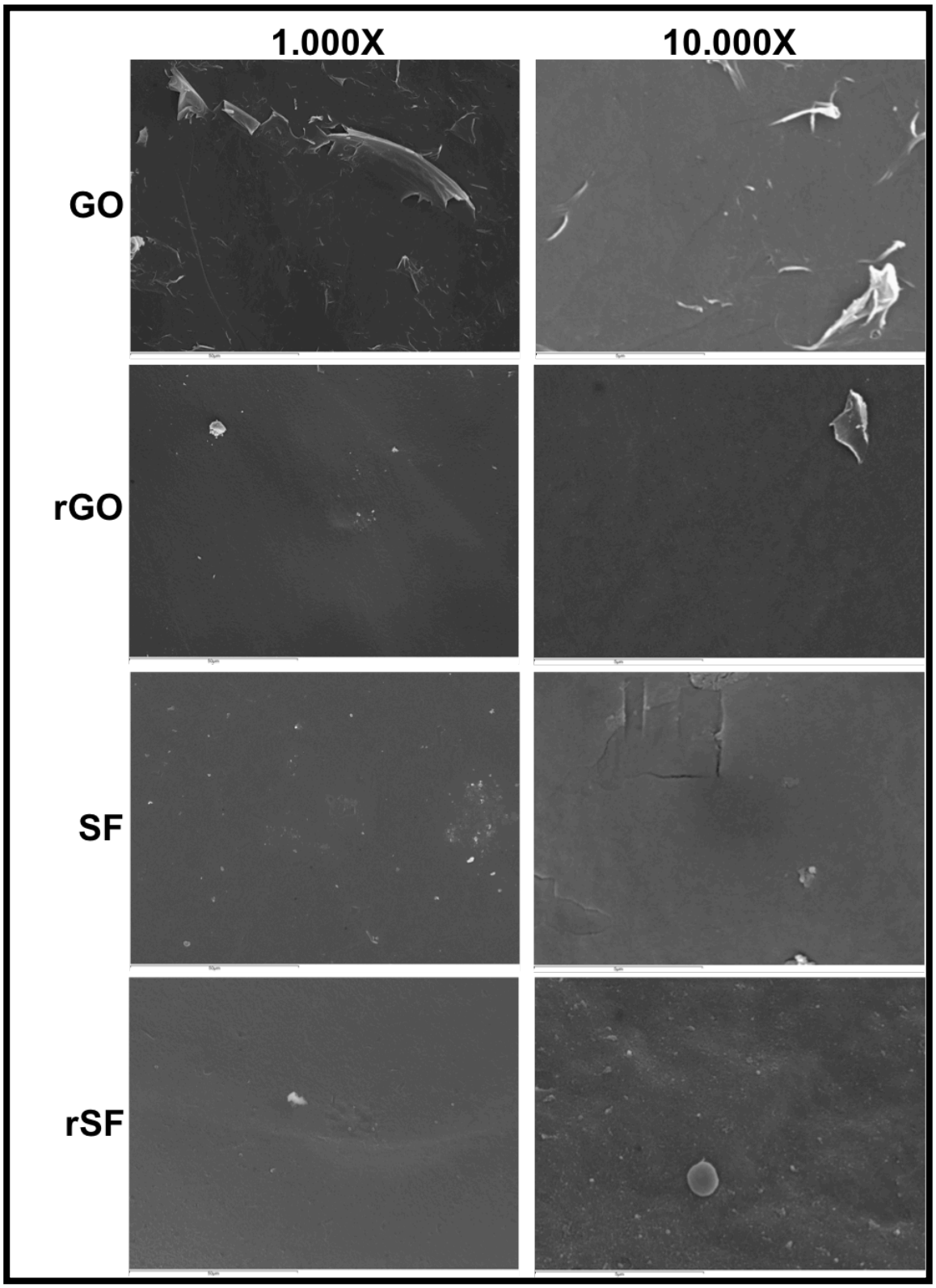

Figura 21. Micrografías a diferentes aumentos de los materiales elaborados con SF y GO puros e independientemente, antes y después del tratamiento con ácido ascórbico (rSF y rGO).

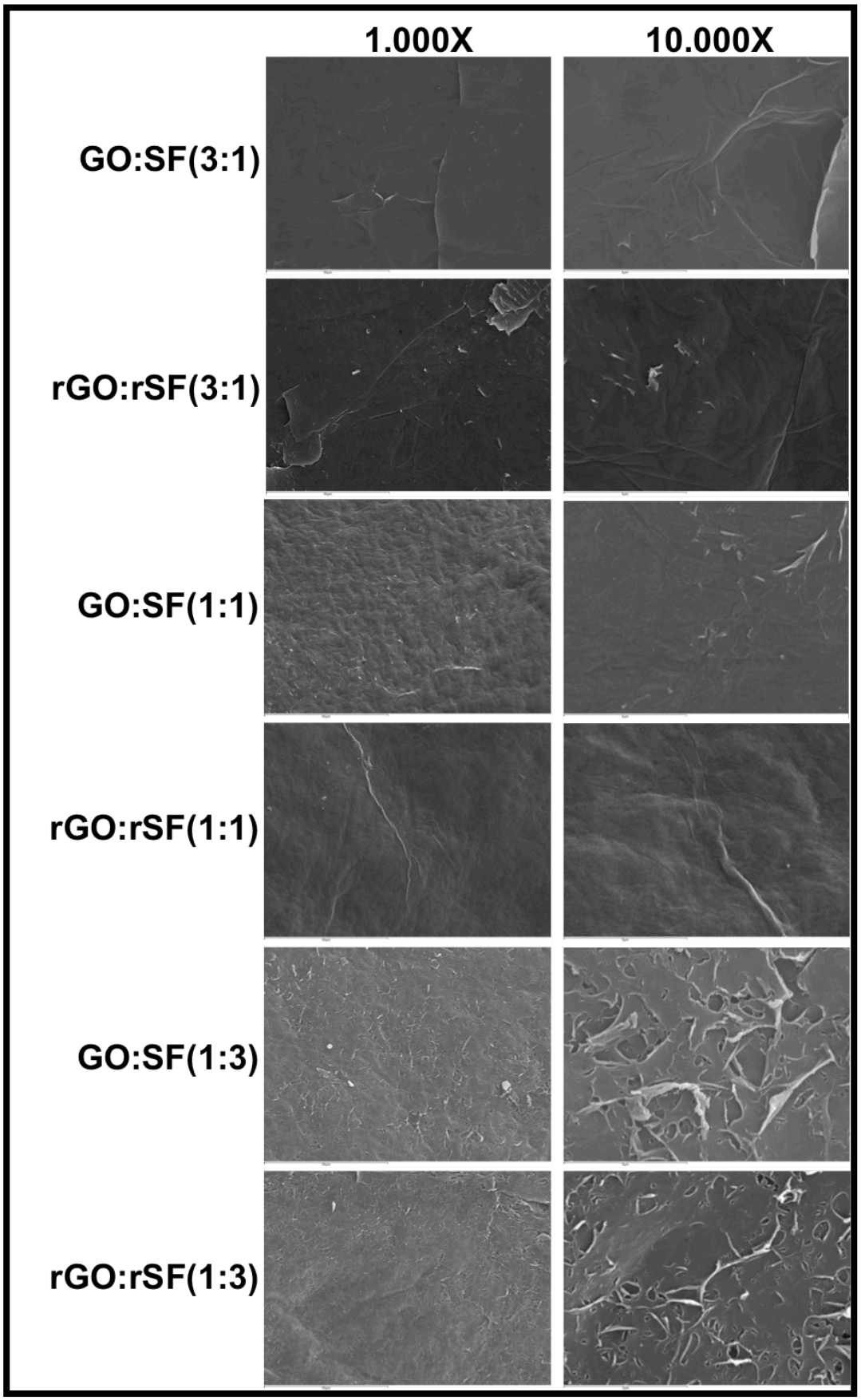

Figura 22. Micrografías a diferentes aumentos de los biomateriales elaborados mezclando SF y GO en distintas proporciones. Nótese cómo aumentan las irregularidades de la superficie del *film* conforme se incrementa el contenido en fibroína.

Finalmente, las disposiciones en bicapa donde la fibroína se colocaba en la parte superior, SF/GO y rSF/rGO, presentaron un aspecto similar al de las configuraciones puras de fibroína, mientras que las bicapas invertidas, GO/SF y rGO/rSF, no ofrecieron similitudes con las versiones puras de grafeno, GO y rGO (Fig. 23). Sorprendentemente, el aspecto de los *films* GO/SF y rGO/rSF se ajustó a una superficie rugosa con estrías en diferentes orientaciones y profundidades, lo que les provee de características similares a un *scaffold* 3D (Fig. 22). Este fenómeno se podría deber a pliegues generados en la primera capa de SF, sobre la que se vierte la suspensión de GO durante la fabricación del material, con el fin de cubrirla totalmente. Los pliegues y ondulaciones podrían originarse por cambios conformacionales que se den en la capa de SF ya insolubilizada al rehidratarse por el vertido de GO acuoso, quedando improntadas las estrías y ondulaciones en la cobertura de GO elaborada secundariamente tras su secado.

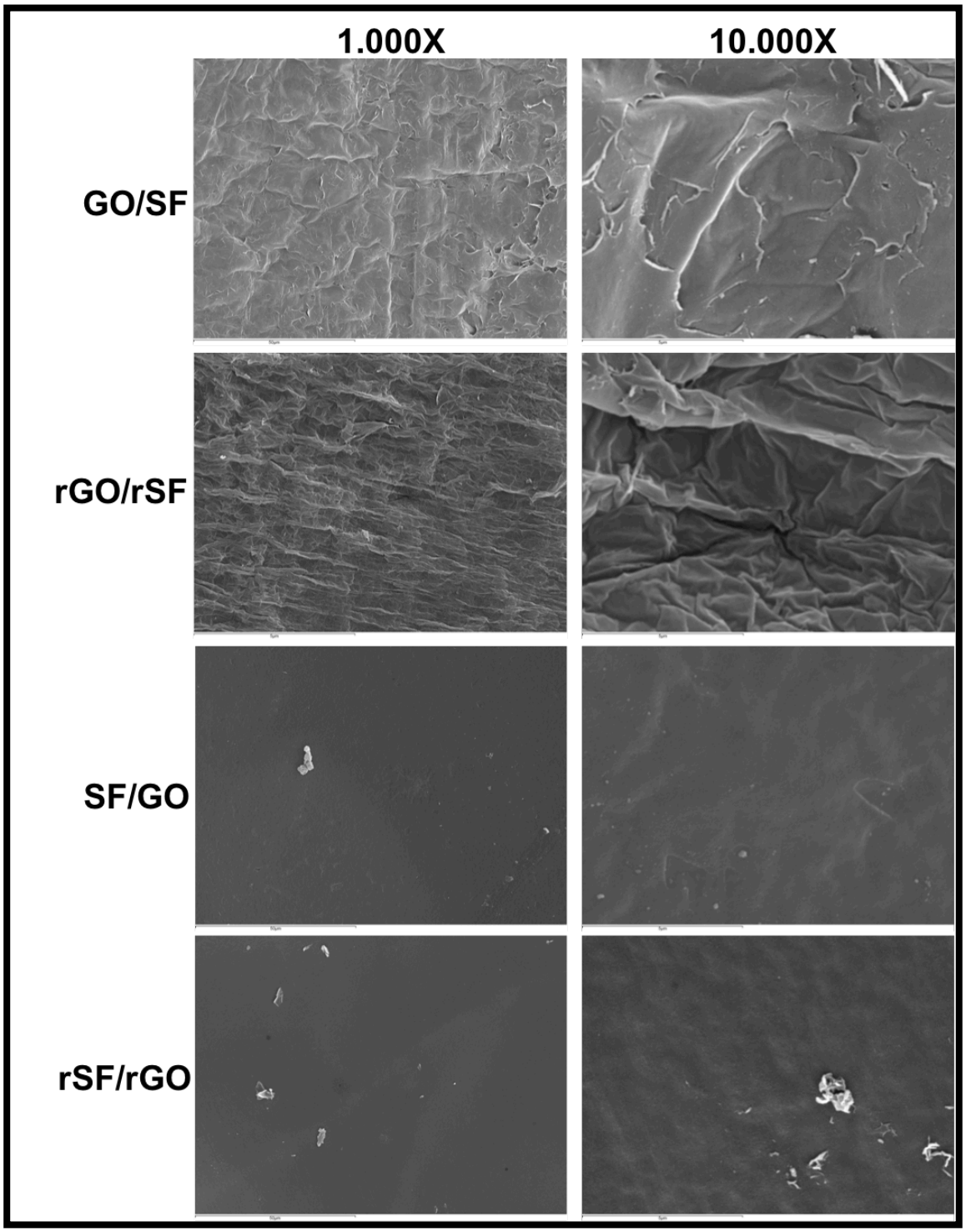

Figura 23. Micrografías a diferentes aumentos de los biomateriales dispuestos en bicapa. En el máximo aumento destaca el aspecto tridimensional de los *films* en los que el grafeno se sitúa en la parte superior de la bicapa.

4.3. ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA DE hPDLSCs SOBRE DIFERENTES *FILMS* BASADOS EN GRAFENO Y FIBROÍNA

La evaluación de la morfología y adhesión celulares y su correlación con la topografía del sustrato sobre el que se cultivan es un aspecto fundamental en el ámbito de la ingeniería de tejidos. Se ha descrito que las hMSCs cultivadas sobre distintos materiales cerámicos con diferentes tamaños de grano podrían verse afectadas en cuanto a su proliferación celular independientemente de la composición química de su superficie, rugosidad o cristalización (257). Oh y col. observaron un descenso en la adhesión de hMSCs sobre nanotubos de TiO_2 de distintos diámetros (258) coincidiendo con los hallazgos de McBeath y col., que detectaron una relación entre morfología celular y diferenciación en este tipo de células (259). En un concepto más amplio, Li y col. proponen que el desorden a mayor escala descrito en grafeno obtenido por CVD podría jugar un papel importante en la adsorción de proteínas, adhesión, proliferación y diferenciación celular (260).

Yim y col. propusieron que la nanotopografía de los biomateriales puede ser decisiva en la organización del citoesqueleto y las adhesiones focales en hMSCs, empleando entramados de poliestireno y polidimetilsilixano con compararon con controles sin entramado (261). De acuerdo con lo expuesto, y en un estudio anterior del mismo grupo, se asoció una baja expansión celular de PDLSCs cultivadas sobre compuestos de fibroína a un descenso en los filamentos de F-actina (184). Nuestro grupo también observó que las adhesiones iniciales detectadas en hPDLSCs sobre *films* de SF fueron significativamente más bajas ($p<0.05$), en comparación con los *films* de GO puro y la mezcla de GO y SF (184).

Las hPDLSCs presentan una morfología en forma de huso en cultivo de mantenimiento (Fig. 20D). En este trabajo, el análisis de los materiales celularizados tras 10 días de crecimiento confirmó que no se apreciaban diferencias en la morfología de las hPDLSCs entre las versiones oxidadas y reducidas del mismo constructo (Fig. 24). Es importante señalar que los *films* en los que las células contactaban directamente con fibroína (SF, rSF, SF/GO y

rSF/rGO), la morfología de las hPDLSCs se vio claramente afectada, exhibiendo una menor expansión celular con la que se perdía el aspecto fusiforme (Fig. 24*). Este efecto en la morfología podría estar estrechamente asociado a alteraciones en la adhesión dependiente de integrinas, como explican Park y col., que registraron una expansión celular reducida tras tratar MSCs con anticuerpos frente a integrinas β1 (262). Por el contrario, en el resto de biomateriales las hPDLSCs mostraron una morfología fusiforme. Nayak y col. hicieron observaciones similares al no detectar que el grafeno influyera en las hMSC pero sí los substratos de polietileno y polidimetilsiloxano no recubiertos de grafeno, donde las células adoptaron una morfología redondeada o irregular (199).

En las observaciones de la densidad celular no se detectaron diferencias entre las versiones oxidada y reducida del mismo *film*. Las proporciones GO:SF(1:1), mostraron una densidad celular media-baja, siendo ésta muy baja en las configuraciones GO:SF(3:1) (Fig. 24). En comparación, la proporción inversa GO:SF(1:3) exhibió una vasta colonización celular, permitiendo la formación de una monocapa de células que cubría la superficie (Fig. 24). Los *films* sobre los que las hPDLSCs habían sufrido cambios en la morfología (SF, rSF, SF/GO y rSF/rGO) también mostraron una baja densidad celular (Fig. 24). En el caso de los *films* puros grafeno, GO y rGO, y las bicapas en las que éstos estaban en la superficie, las imágenes obtenidas revelan una densidad celular media-alta en todos los casos (Fig. 24).

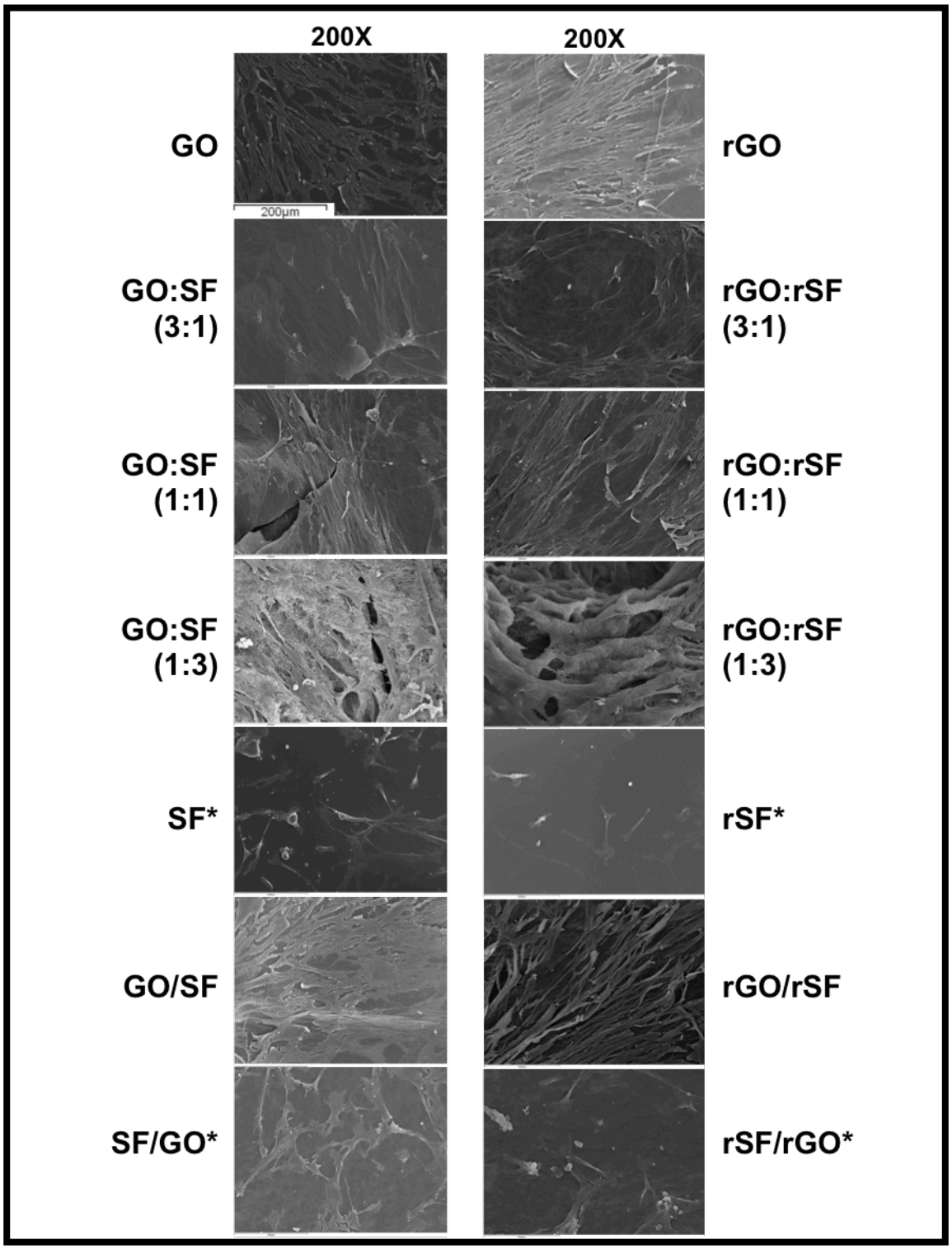

Figura 24. Morfología adoptada por las hPDLSCs sobre cada biomaterial tras 10 días en cultivo. Las configuraciones señaladas con un asterisco muestran células sin morfología fusiforme. Nótese la monocapa en la que se disponen las hPDLSCs en las proporciones 1:3.

4.4. PROLIFERACIÓN DE hPDLSCs SOBRE DIFERENTES *FILMS* BASADOS EN GRAFENO Y FIBROÍNA

Para conocer la idoneidad de un biomaterial destinado a la ingeniería de tejidos, en nuestro caso empleando hPDLSCs, es fundamental explorar la capacidad de proliferación de las células sobre ellos. La mayoría de los trabajos publicados en este sentido han empleado preparaciones en materiales cerámicos o basados en HA, como cerámicas de diópsido (263), biocerámicas de $Ca_7Si_2P_2O_{16}$ (264), zein (265) o nanopartículas conformadas con nanotubos de carbono e HA (266). También se han obtenido diferentes resultados comparado las tasas de proliferación celular en pequeños grupos de biomateriales. Ge y col. observaron que las hPDLSCs crecían mejor sobre genepina-quitosano recubiertos con HA que sin ella (267). En otra publicación, tras analizar diferentes proporciones, concluyeron que la proliferación celular mejoraba en los materiales formados por colágeno e HA en proporción 80:20 y 50:50 (268). También se han estudiado las membranas de ácido poli-d,l-láctico (PDLLA), obteniendo una mejor proliferación sobre compuestos de PDLLA/Bioglass® que en membranas puras de PDLLA (269). El titanio ha sido otro de los materiales probados en esta aplicación. Se cultivaron hPDLSCs sobre superficies rugosas de discos de titanio consiguiendo una mejor proliferación sobre aquéllas tratadas con partículas de Al_2O_3 de 75 μm (270). Xie y col. experimentaron con grafeno, obteniendo un mayor crecimiento de las hPDLSCs sobre láminas de cristal recubiertas con este material en la configuración tridimensional del grafeno que en la bidimensional (271). En el presente trabajo se han diseñado un alto número de configuraciones de biomateriales de GO y SF para, entre otras cosas, encontrar la más adecuada en términos de proliferación celular.

La tasa de proliferación de las hPDLSCs se analizó mediante el ensayo MTT a distintos tiempos post-siembra (4, 7 y 10 días) sobre los diferentes *films*. Observando los resultados en conjunto, la proliferación significativamente más alta se obtuvo después de cultivar hPDLSCs durante 10 días sobre los *films* de GO y rGO:rSF(1:3) ($p<0,05$), no encontrando diferencias significativas entre ambos ($p=1,00$)(Fig. 25).

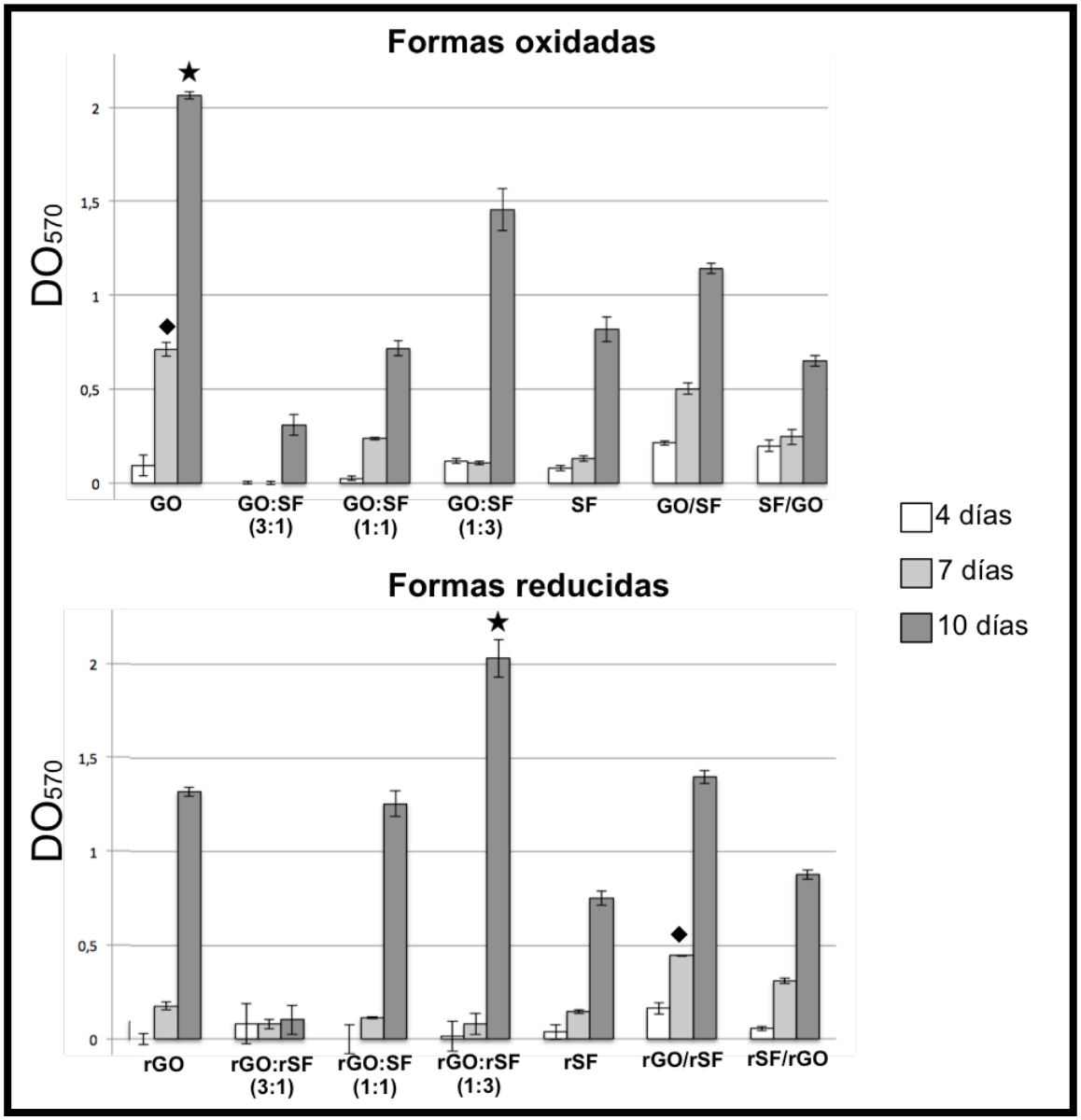

Figura 25. Tasa de proliferación de hPDLSCs tras 4, 7 y 10 días en cultivo sobre los distintos biomateriales estudiados. Los diamantes y estrellas señalan los *films* con la proliferación más alta de forma significativa ($p<0,05$), a 7 y 10 días respectivamente, respecto al resto de biomateriales. Los datos se presentan como valores medios de densidad óptica (DO) medida a 570 nm (n=5).

Tras 7 días en cultivo, el GO ya presentó la proliferación significativamente más alta con respecto al resto de *films* ($p<0,05$), incluyendo su versión reducida, rGO ($p=0,002$) (Fig. 26). Inmediatamente por debajo, se encontraron las configuraciones en bicapa GO/SF y rGO/rSF, entre las que no se encontraron diferencias significativas ($p=0,512$), aunque el grado de

proliferación detectado en estas dos configuraciones sí fue significativamente mayor al resto de biomateriales (p<0,05) (Fig. 26).

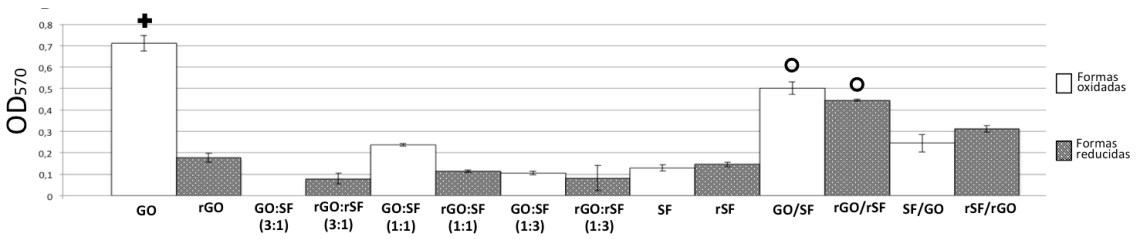

Figura 26. Proliferación de hPDLSCs 7 días después de la siembra. La cruz indica la proliferación más alta con significación estadística (p<0,05). El círculo indica que no existen diferencias significativas de absorbancia entre las distintas versiones del mismo *film* pero sí una proliferación mayor que en los biomateriales sin símbolo (p<0,05). Los datos se presentan como valores medios de densidad óptica medida a 570 nm (n=5).

4.4.1. *FILMS* OXIDADOS VS REDUCIDOS

En el caso de las configuraciones puras, tras 10 días en cultivo, el crecimiento de las hPDLSCs fue mayor de forma significativa sobre GO que sobre rGO (p=0,023)(Fig. 27). En el caso de la fibroína no se detectaron diferencias significativas entre SF y rSF (p=0,653)(Fig. 27), lo que sugiere que el tratamiento con ácido ascórbico no afecta la proliferación celular sobre fibroína. Hay que recordar, que el tratamiento de las placas con ácido ascórbico buscaba reducir el óxido de grafeno, pero no inducir ninguna modificación química en la fibroína y que los *films* fueron posteriormente lavados, con lo cual no debía quedar en el material este componente. Ello hace que el resultado anteriormente expuesto sea totalmente coherente con e esperado.

En las configuraciones donde variaba la proporción de cada biomaterial (GO:SF), se observaron diferencias significativas entre las formas oxidadas y reducidas de las proporciones 1:1 (p=0,006) y 1:3 (p=0,045), pero no en la 3:1 (p=0,123). Además, la configuración en la que GO y rGO se encontraban en mayor proporción (3:1), obtuvo a los 10 días los datos más bajos de absorbancia, siendo éstos significativamente menores al resto de biomateriales (p<0,05).

En el caso de los *films* dispuestos en bicapa, no se encontraron diferencias significativas entre la versión oxidada y reducida de cada disposición (Fig. 27).

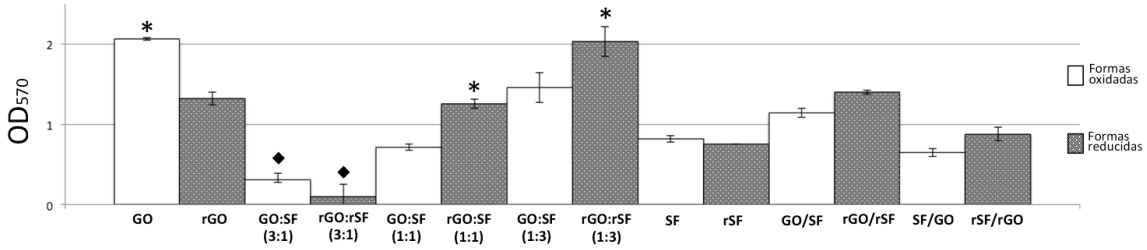

Figura 27. Proliferación de hPDLSCs 10 días después de la siembra. El asterisco indica una proliferación significativamente más alta ($p<0,05$) entre la versión oxidada y reducida del mismo *film*. El diamante indica una proliferación significativamente más baja que el resto de configuraciones. Los datos se presentan como valores medios de densidad óptica medida a 570 nm (n=5).

Estos resultados sugieren que, en términos de proliferación, los mejores biomateriales sobre los que crecen las hPDLSCs son el GO y la proporción rGO:rSF(1:3), no habiendo diferencias significativas entre ellos ($p=1,00$), como se indicó anteriormente (Fig. 25). Cuando se combinan GO y SF en los diferentes ratios o dispuestos en bicapa, se observa la tendencia general de que la proliferación es mayor en las versiones reducidas que en las oxidadas (Fig. 27).

4.4.2. SINERGISMO ENTRE BIOMATERIALES BASADOS EN GRAFENO Y FIBROÍNA

Aunque Li y col. publicaron un trabajo con espumas de grafeno en las que este material por sí mismo constituía un soporte tridimensional para crecimiento celular (186), hasta la fecha no se han presentado *scaffolds* de estas características con GO. Como se ha comentado anteriormente, una de las razones por las que se ha mezclado GO y SF se basa en las características 3D que la SF puede aportar al GO y la necesidad de emplear *scaffolds* tridimensionales en ingeniería de tejidos. Xie y col. han obtenido recientemente mejores resultados de proliferación de hPDLSCs en preparaciones

tridimensionales de grafeno que en las bidimensionales. Los *scaffolds* 3D se fabricaron sobre una base de espuma de níquel como soporte para el grafeno, mientras que los 2D estaban constituidos por una lámina de cristal recubierta con grafeno (271). Sin embargo, a priori, el níquel resulta un metal menos biocompatible que cualquier biomaterial de origen natural como es la fibroína. A diferencia de la publicación de Xie, el trabajo recientemente aportado por Lee y col. no encontró diferencias significativas en la proliferación de hMSCs al crecer sobre rGO o un *scaffold* 3D de HA recubierto por rGO (272). Nuestros resultados estarían en la línea de este segundo trabajo, ya que no se encontraron diferencias significativas en la proliferación de las hPDLSCs al crecer sobre rGO y la bicapa con características 3D de rGO/rSF ($p=0,946$)(Fig. 27).

Es necesario recordar que los valores más altos de proliferación celular correspondieron a los obtenidos en cultivos sobre *films* de GO puro y la mezcla rGO:rSF(1:3). Sorprende, por tanto, que la proliferación celular mejore cuanto menor es la proporción de grafeno en las configuraciones donde ambos materiales se mezclan en diferentes proporciones (Fig. 27). Sin embargo, al considerar una eventual aplicación posterior de estos dos biomateriales, es importante señalar la baja consistencia del *film* de GO al ser manipulado, material que se descartaría en favor del *film* de rGO:rSF(1:3), cuya integridad fue superior (datos no mostrados).

No se detectaron diferencias significativas ($p>0,05$) entre la proliferación alcanzada en las configuraciones puras de fibroína (SF y rSF) y las bicapas en las que la fibroína queda en contacto directo con las células (SF/GO y rSF/rGO), siendo ésta moderada (Fig. 27). Este comportamiento es similar en el caso de las bicapas con rGO orientado hacia el cultivo celular y rGO puro ($p=0,946$), pero no ocurrió lo mismo en las versiones oxidadas, donde la proliferación fue en GO significativamente superior a la configuración GO/SF ($p=0,000$)(Fig. 27).

4.5. CITOTOXICIDAD DE *FILMS* BASADOS EN GRAFENO Y FIBROÍNA SOBRE hPDLSCs

La biocompatibilidad de los biomateriales es un prerrequisito para la generación óptima de *scaffolds* celularizados. Esta característica les permite ser elegidos y empleados como herramientas terapéuticas en aplicaciones clínicas específicas. Para este propósito y con el fin de evaluar la posible citotoxicidad de las diferentes configuraciones de los films basados en grafeno y fibroína, se investigó la viabilidad de las hPDLSCs cultivadas en los distintos biomateriales midiendo la unión de Anexina-V y 7-aminoactinomicina D (7-AAD), mediante citometría de flujo. La primera conjugada con un marcaje fluorescente (FITC en nuestro caso), se utilizó como indicador de apoptosis temprana ya que se une a la fosfatidilserina, proteína que se detecta en las membranas de células dañadas o en fases tempranas de apoptosis. Por otro lado la 7-AAD es una molécula fluorescente *per se* con una fuerte afinidad por los ácidos nucleicos, cuya incapacidad para atravesar las membranas celulares no dañadas la hacen ideal en la determinación de mortalidad de las células en cultivo. Este método permite diferenciar tres poblaciones celulares en función de la fluorescencia detectada: células vivas (Anexina-V^-/7-AAD^-), apoptosis temprana (Anexina-V^+/7-AAD^-) y apoptosis tardía y células necróticas (Anexina-V^+/7-AAD^+ y Anexina-V^-/7-AAD^+).

En un estudio previo, nuestro grupo determinó que las hPDLSCs cultivadas en SF, GO o GO:SF(1:3) mostraron solo una ligera muerte celular, con más del 85% de células viables después de 7 días en cultivo sobre los biomateriales (184). De acuerdo con estos resultados, las distintas configuraciones de los biomateriales integrados por fibroína y grafeno, en su forma oxidada o reducida, presentados en este estudio mostraron que la viabilidad de las hPDLSCs fue mayor del 95% tras 10 días en cultivo (Fig. 28). Se puede afirmar, por tanto, que los biomateriales basados en grafeno y fibroína pueden ser considerados *scaffolds* biocompatibles prometedores que utilizados en la configuración adecuada pueden preservar la proliferación, viabilidad y función de las hPDLSCs.

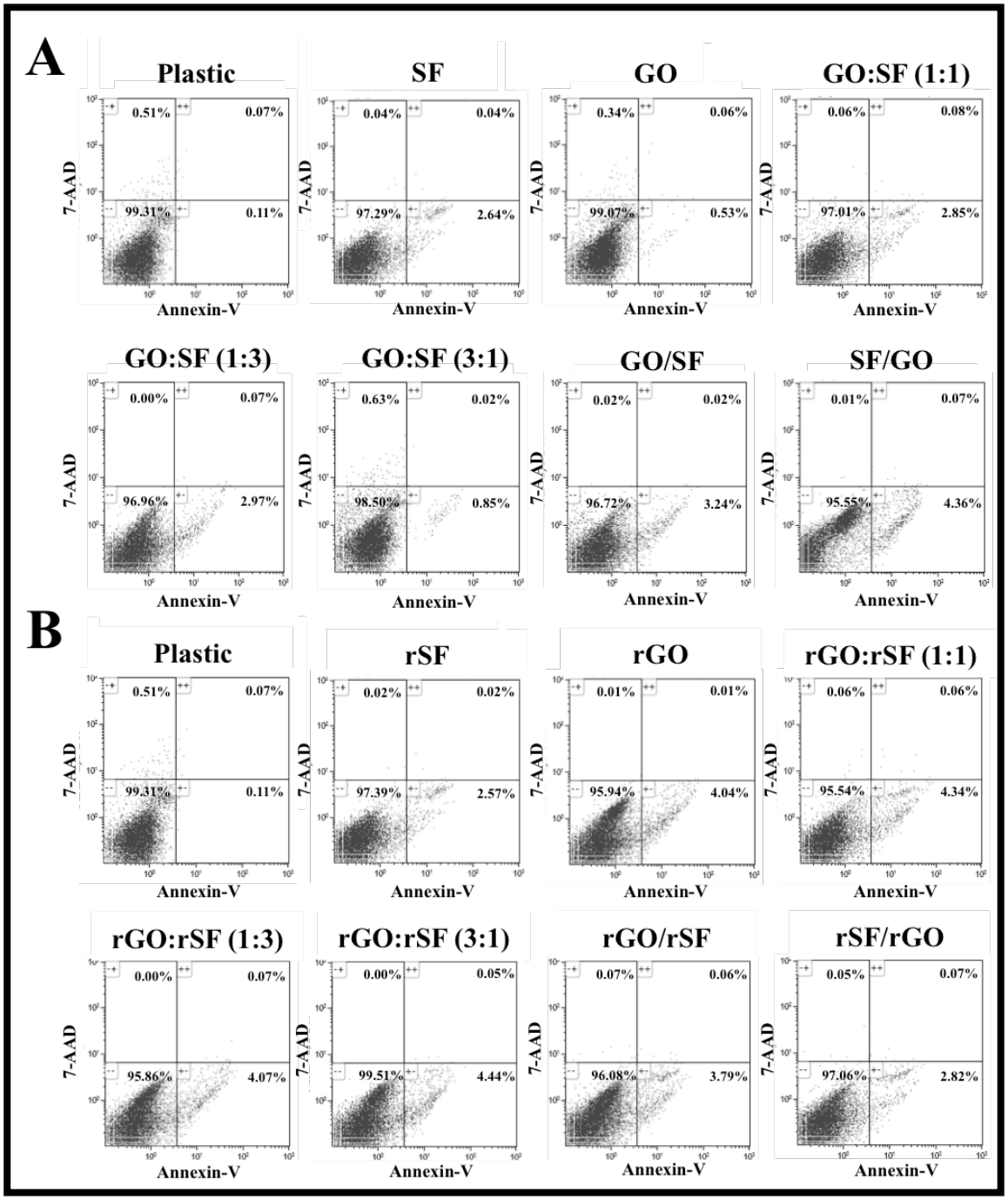

Figura 28. Viabilidad de hPDLSCs tras 10 días en cultivo sobre distintos *films* compuestos por GO y SF (A) y su versión reducida (B). Nótese cómo en todos los *films* la viabilidad de las hPDLSCs supera el 95%.

4.6. EXPRESIÓN DE MARCADORES DE SUPERFICIE DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES EN hPDLSCs CULTIVADAS SOBRE *FILMS* BASADOS EN GRAFENO Y FIBROÍNA

Con el fin de confirmar el fenotipo mesenquimal de la hPDLSCs procedentes de cultivos primarios de hPDL y determinar los posibles cambios fenotípicos tras su cultivo en los distintos materiales de grafeno y fibroína, se llevaron a cabo estudios de citometría de flujo.

En todos los biomateriales analizados, se expresaron las moléculas de superficie CD73, CD90 y CD105 de MSCs a niveles superiores al 99,5%, mientras que los marcadores hematopoyéticos CD14, CD20, CD34 y CD45 quedaron por debajo del 5% (Fig. 29). Aunque la renovación de los marcadores de superficie de las MSC podría estar ligeramente sobre- o desregulada en respuesta a la confluencia y al ciclo celular, las hPDLSCs cultivadas durante 10 días mostraron mayoritariamente una desregulación significativa de la expresión de CD73, CD90 y CD105, principalmente cuando los materiales contenían grafeno reducido en su composición. Algunos autores han publicado que los niveles de marcadores mesenquimales disminuían progresivamente en MSCs durante su diferenciación multilinaje, incluyendo la diferenciación hacia células osteoblásticas (273–275). Estos resultados sugieren que los *films* basados en grafeno y fibroína podrían ser biomateriales adecuados para su uso como inductores espontáneos de diferenciación osteogénica de hPDLSCs.

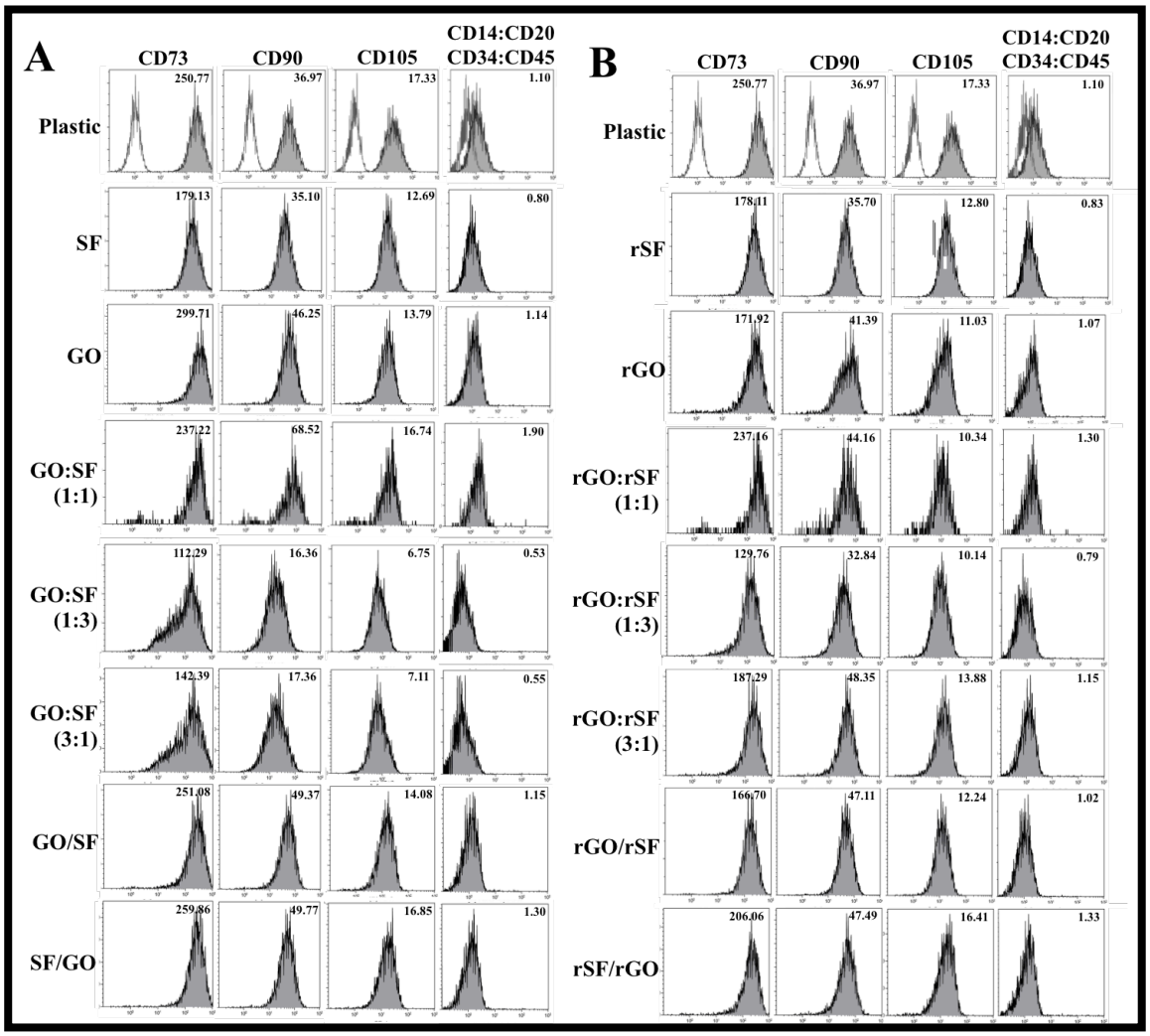

Figura 29. Expresión de marcadores de superficie de células madre mesenquimales (CD73, CD90 y CD105) en hPDLSCs cultivadas sobre distintos *films* compuestos por GO y SF (A) y su versión reducida (B). Se aprecia un fenotipo claramente mesenquimal con valores muy bajos de marcadores hematopoyéticos (CD14, CD20, CD34 y CD45).

4.7. CO-EXPRESIÓN DE FACTORES FENOTÍPICOS CEMENTOBLÁSTICOS DURANTE LA DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA DE hPDLSCs

El grafeno parece actuar sobre algunos tipos de células madre como apuntan los resultados descritos por algunos autores estimulando la diferenciación de células madre neurales a neuronas (186,276,277), MSCs a osteoblastos (199,272), PDLSCs a osteoblastos (271) e iPSCs a diferentes linajes celulares (198). El cemento es un tejido calcificado de forma heterogénea que representa una estructura rígida de anclaje al diente para dar lugar a los cementoblastos. Los cementoblastos derivan de MSCs indiferenciadas localizadas en el tejido conectivo del folículo dental. Las hPDLSCs también han demostrado ser una fuente de cementoblastos y osteoblastos, al formar cemento y hueso alveolar, respectivamente (230,278,279). Es importante señalar que el cemento expresa ciertas moléculas y factores únicos que promueven la quimiotaxis, migración, adhesión, reclutamiento, proliferación y diferenciación de algunas hPDLSCs (278,279).

Usando condiciones hiperfosfatémicas mediante formulaciones comerciales o una mezcla de β-glicerolfosfato, ácido ascórbico y dexametasona, se ha demostrado la inducción de mineralización en hPDLSCs y la diferenciación de osteoblastos (280). En este trabajo, se utilizó un medio de diferenciación osteogénica comercial para diferenciar hPDLSCs a células similares a osteoblastos como control positivo para la expresión de genes específicos. La mayoría de los genes no mostraron una distribución normal en cuanto a sus datos de expresión y, por lo tanto, se representaron en gráficos de cajas para que se visualizasen de forma más fidedigna los resultados obtenidos.

Las células cultivadas sobre plástico en medio Oteodiff® mostraron un aumento natural en la expresión de los genes relacionados con osteoblastos (RUNX2, SP7/OSX, BGLAP, COL1A1 y ALP), condroblastos (SOX9) y cementoblastos (PTPLA/CAP y CEMP1) comparado con la expresión observada en medio de mantenimiento (Fig. 30), coincidiendo estos resultados con los obtenidos por Choi y col. (230). Tras 10 días bajo inducción

osteogénica, no se detectó expresión de DSPP, como se esperaba para hPDLSCs (datos no mostrados)(281).

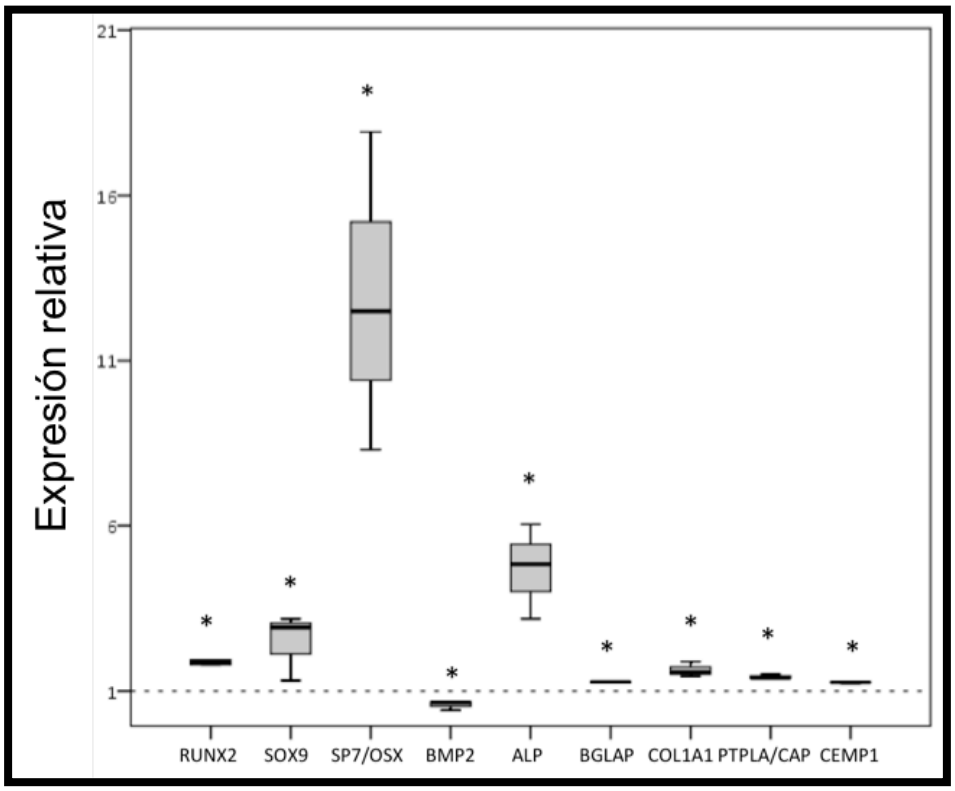

Figura 30. Perfil osteoblástico de expresión génica mostrado por las hPDLSCs cultivadas durante 10 días sobre plástico en medio de diferenciación osteogénico, Osteodiff®. El análisis de los marcadores fenotípicos de osteoblastos, condroblastos y cementoblastos se realizó mediante PCR cuantitativa.

Durante los días que duró la inducción osteogénica se analizó la mineralización funcional de las hPDLSCs a través de su observación mediante un microscopio de campo claro, hallando depósitos de calcio en forma de precipitados oscuros sobre la monocapa de células (Fig. 31).

Estos resultados en conjunto, indicaron que las hPDLSCs tienen plasticidad fenotípica y capacidad para diferenciarse a cementoblastos o a osteoblastos funcionales a través de intermediarios condroblásticos, sugiriendo así su uso potencial para lograr un fenotipo preferiblemente a cementoblasto.

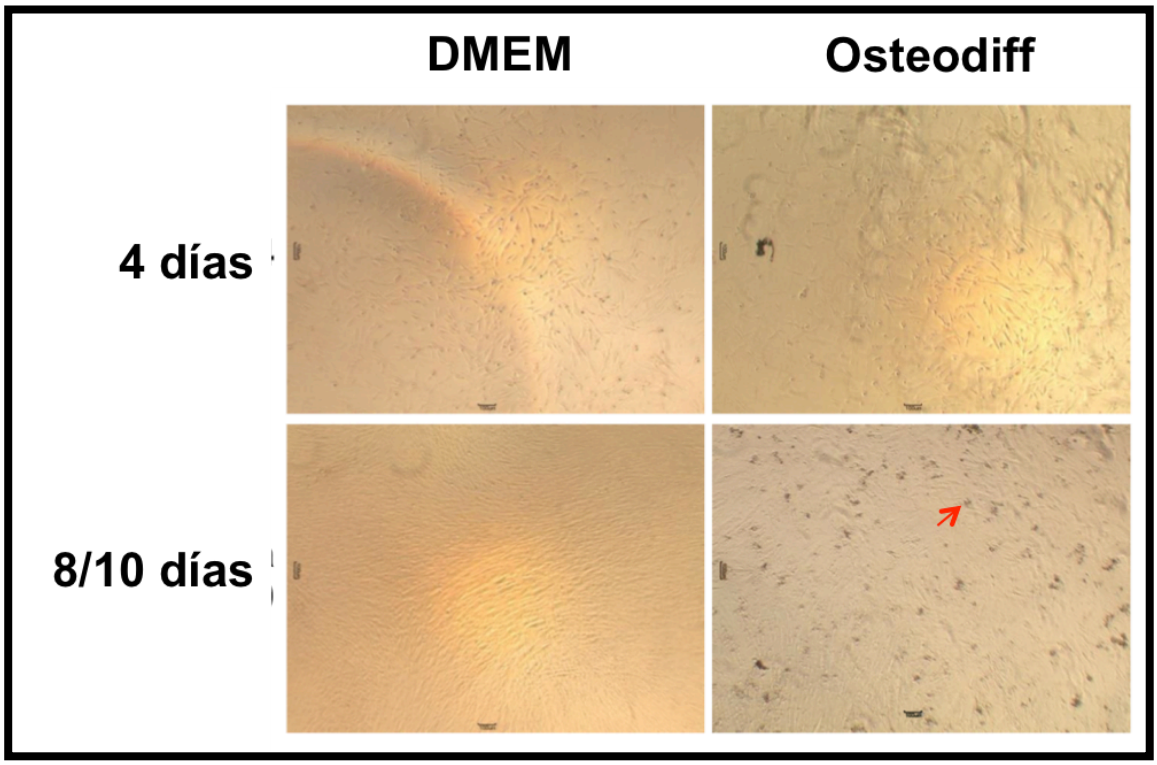

Figura 31. Diferenciación funcional mediante mineralización de las hPDLSCs. A través del microscopio óptico de campo claro se observaron depósitos oscuros (flecha roja) tras 8-10 días de cultivo en medio Osteodiff® (imagen inferior derecha)(aumentos: 4X).

4.8. SOBRE-EXPRESIÓN DE GENES CEMENTOBLÁSTICOS EN hPDLSCs CULTIVADAS SOBRE *FILMS* BASADOS EN GRAFENO Y FIBROÍNA

Las preparaciones de hPDLSCs sembradas en *scaffolds* biocompatibles de grafeno 3D emergen como una técnica a valorar en la implantación de este tipo de células debido a que mejoran su proliferación, supervivencia y diferenciación (271). Una vez conocida la capacidad de proliferación y viabilidad de las hPDLSCs sobre los *films* de GO y SF (Fig. 25 y Fig. 28), se llevaron a cabo ensayos de expresión génica para caracterizar el efecto de estos substratos sobre la diferenciación de las hPDLSCs hacia células similares a las formadoras de hueso. Las determinaciones se realizaron tras 10 días en cultivo para determinar el efecto potencial de los diferentes *films* sobre la diferenciación de las hPDLSCs asociándolos con los datos de proliferación y supervivencia.

Se observó que las configuraciones reducidas de los *films* inducían la sobreexpresión de marcadores tempranos de osteoblastos/cementoblastos, incluyendo BMP-2, RUNX2, ALP y COL1A1 (Fig. 32 y 33). Sin embargo, los marcadores definitivos de diferenciación osteoblástica (SP7/OSX, BGLAP) y condroblástica (*SOX9*) no mostraron cambios en la expresión (Fig. 32 y 33). Se esperaba la sobre-expresión natural de BMP-2 y RUNX2 durante el proceso de diferenciación de las hPDLSCs (281). Todas las configuraciones puras de los *films* (GO, rGO, SF y rSF) estimularon la sobreexpresión de BMP-2 y RUNX2, obteniendo resultados concordantes en las versiones correspondientes con la misma superficie en bicapa en contacto con las células (GO/SF, rGO/rSF, SF/GO y rSF/rGO)(Fig. 32 y 33). Estos resultados fueron similares a la sobre-expresión obtenida por Xie y col. empleando *scaffolds* 2D y 3D de grafeno (271). Tanto la diferenciación osteoblástica como la cementoblástica implica una serie de eventos transcripcionales que son dependientes de RUNX2/Cbfa (282), el efector aguas abajo para BMP-2. Se ha descrito que varios factores de crecimiento pertenecientes a la familia TGF-β, incluyendo BMPs como BMP-2, BMP3, BMP4 y BMP7, promueven la proliferación, diferenciación y mineralización de supuestos cementoblastos (282) así como la reabsorción de dentina y la nueva formación de cemento sobre las superficies de dentina

(283). RUNX2/Cbfa es un promotor de la expresión de SP7/OSX en etapas tardías de la diferenciación de osteoblastos. Es importante destacar que Torii y col. hallaron una expresión disminuida de SP7/OSX durante la etapa final de diferenciación a cementoblastos (281), por lo que los resultados obtenidos en los *films* podrían sugerir una tendencia a la diferenciación hacia cementoblastos en lugar de a la no deseada, desde un punto de vista terapéutico, diferenciación osteoblástica.

Por otro lado, la propia síntesis y ensamblaje de una matriz extracelular (MEC) rica en colágeno juega un papel crucial en la diferenciación osteoblástica y cementoblástica durante la etapa de síntesis de MEC, debido a que la MEC es una estructura que será sustituida cuando se produzca la mineralización. El colágeno tipo I es el colágeno más abundante encontrado en hueso y dientes (249). Forma una estructura polimérica que incluye tres cadena polipeptídicas, conteniendo dos cadenas pro-α1 y una cadena pro-α2. Se midieron, por lo tanto, los niveles de expresión del mRNA de COL1A1 por ser el principal integrante de la molécula de pro-colágeno. La sobre-expresión de COL1A1 se asoció a casi todos los substratos, aunque ésta fue particularmente destacada en las preparaciones reducidas rGO y rGO/rSF (Fig. 33). La expresión génica de ALP se midió como parte de la síntesis de MEC y la descripción de los estados de mineralización. Las configuraciones puras de rGO y rSF, así como la bicapa rGO/rSF indujeron una elevada sobre-expresión de ALP. De una forma menos notable, la configuración pura de SF también indujo sobre-expresión de ALP, contrariamente a los resultados obtenidos en el resto de substratos oxidados (Fig. 33). La ALP es un marcador bien conocido en los procesos de diferenciación ósea debido a que su actividad enzimática pirofosfatasa permite al pirofosfato (un inhibidor natural para la mineralización de tejidos) escindirse en pirofosfato inorgánico (278,282). La sobresaturación resultante de fosfato inorgánico liberado da lugar a la formación de HA y depósitos de fosfato (278,282).

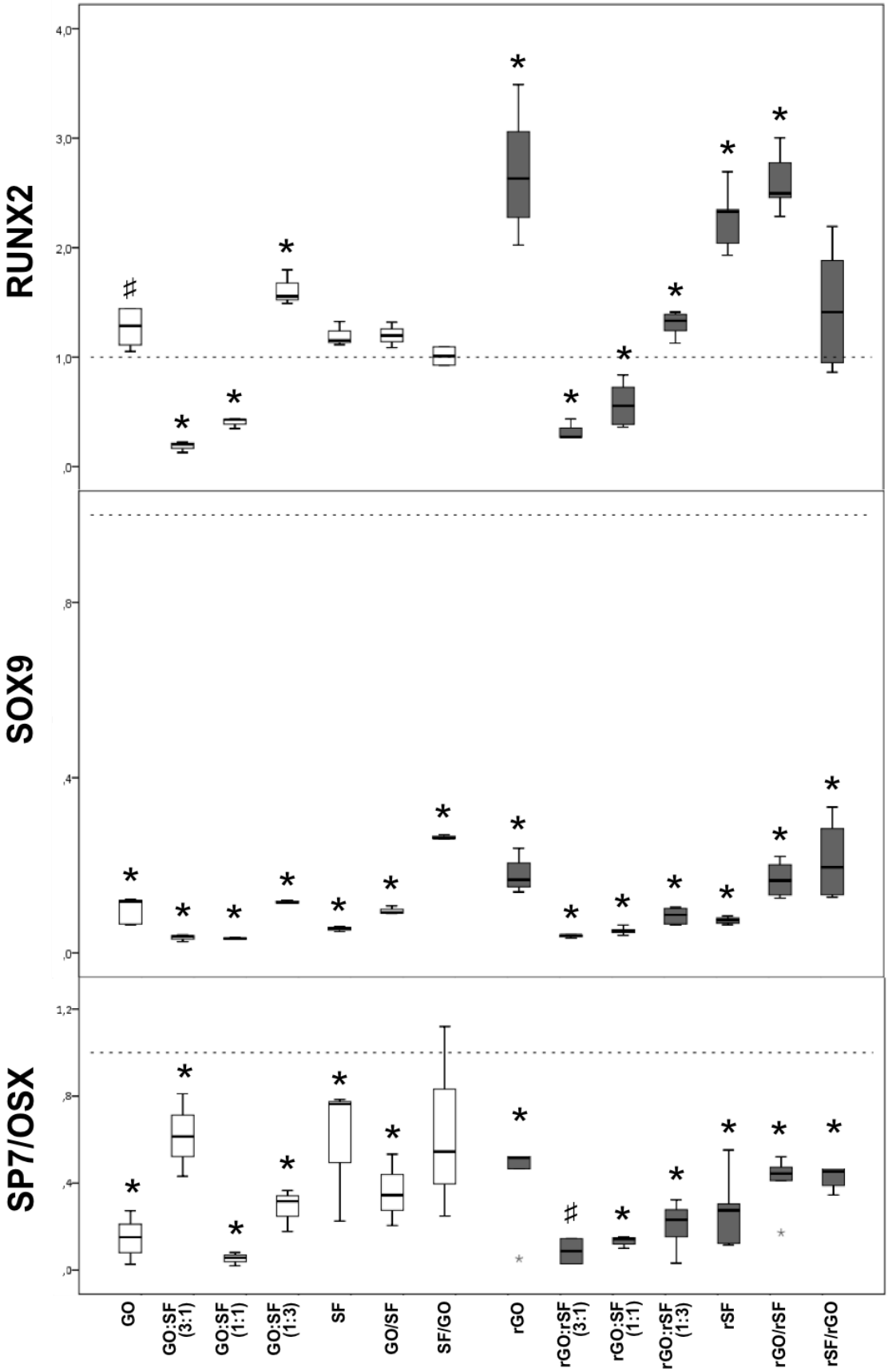

Figura 32. Expresión relativa de RUNX2, SOX9 y SP7/OSX por parte de las hPDLSCs tras 10 días en cultivo sobre los distintos *films* en su versión oxidada (cajas blancas) y reducida (cajas grises). El asterisco indica significación estadística ($p<0,05$); la almohadilla indica tendencia estadística.

En cuanto al gen de la osteocalcina (BGLAP), de manera similar a SP7/OSX, mostró una expresión disminuida de forma significativa en todos los *films*, excepto para rGO y la bicapa rGO/rSF, donde no se vio afectada (Fig. 33). La osteocalcina es una pequeña proteína relacionada con la mineralización que se encuentra de forma abundante en la MEC de hueso, dentina y cemento. Sin embargo, la osteocalcina no se puede expresar durante la maduración y diferenciación de las hPDLSCs (249) y algunos estudios histológicos muestran de forma inequívoca que la inmunotinción positiva de osteocalcina puede depender del tipo de cemento y la localización (278). En consecuencia, los cementoblastos asociados a fibra de cemento acelular extrínseco son negativos para la osteocalcina y también se encuentra una débil o ausente inmunotinción para la fibra celular intrínseca (278). A pesar de los resultados controvertidos, algunos autores han sugerido que podrían ser resultado de las diferencias fenotípicas entre cementoblastos y cementocitos, expresando estos últimos un fenotipo más parecido a osteoblastos (278). Por otra parte, hay hallazgos recientes en terapia celular que han demostrado una diferenciación odonto/cementoblástica con falta de expresión de os teocalcina (Fig. 33), lo que demuestra que esta diferenciación celular se parecía muy poco a osteoblastos (282).

Las hPDLSCs cultivadas sobre los *films* elaborados en este trabajo pueden ser inducidas por los mismos para diferenciarse espontáneamente hacia cementoblastos, como demuestra la expresión de CEMP1 y la baja expresión de los genes específicos de osteocondroblastos. Debido a que los substratos no se asociaron ni a una diferenciación osteoblástica tardía (como demostraron los valores de expresión de OSX y BGLAP) ni a una diferenciación condroblástica (expresión de SOX9 disminuida), se exploró la expresión de genes relacionados con cementos tales como PTPLA/CAP y CEMP1. Mientras que el medio Osteodiff® promovió la sobre-expresión de PTPLA/CAP (Fig. 30), casi todos los *films* se asociaron a una reducción significativa de PTPLA/CAP, excepto en el caso de rGO y las formas oxidada y reducida de fibroína, donde no se vio afectado (Fig. 34). CEMP1, un componente del cemento descrito recientemente, cuya expresión parece estar

limitada a cementoblastos y sus progenitores (254), se encontró sobre-expresado en rGO y todas las configuraciones de las bicapas, aunque hay que destacar que esta sobre-presión fue particularmente elevada en rGO y la bicapa rGO/rSF (Fig. 34). En el promotor de PTPLA/CAP y CEMP1 se ha hallado la existencia de zonas de unión a activadores transcripcionales funcionales en respuesta a miembros de BMP como BMP-2 y BMP7 (253,281). Es importante señalar que recientemente se ha descrito un perfil de expresión dependiente del tiempo para PTPLA/CAP y CEMP1. Torii y col. describieron que la cementogénesis dependiente de BMP7 se asociaba a una sobre-expresión temprana de PTPLA/CAP y una expresión reducida de CEMP1 tras 7 días. Después de 14 días, este escenario se invirtió, siendo PTPLA/CAP el que tuvo reducida su expresión y CEMP1 el gen sobre-expresado, asociado, además, con un aumento en RUNX2 y ALP (281). El grado de expresión registrado en este trabajo tras 10 días para PTPLA/CAP y CEMP1 sugiere una diferenciación cementoblástica avanzada con tendencia a una diferenciación terminal dada la expresión disminuida de OSX (281). A esto hay que añadir que CEMP1 ha demostrado ser un marcador fenotípico de cementoblastos y un regulador de la diferenciación natural de hPDLSCs a células similares a cementosblastos, estando su expresión reducida cuando hPDLSCs se diferencian a osteoblastos (254).

En el caso particular de la ingeniería de tejido óseo, casi todos los materiales artificiales requieren de la administración de múltiples factores de crecimiento o señales bioquímicas para promover la diferenciación de hMSCs. A diferencia de Torii y col., los resultados presentados en este trabajo proporcionan un nuevo escenario para la diferenciación cementoblástica debido a que no ha sido necesaria la adición de ninguno de estos factores, siendo suficiente la siembra de las células sobre estos biomateriales para inducir la diferenciación hacia cementoblastos (281).

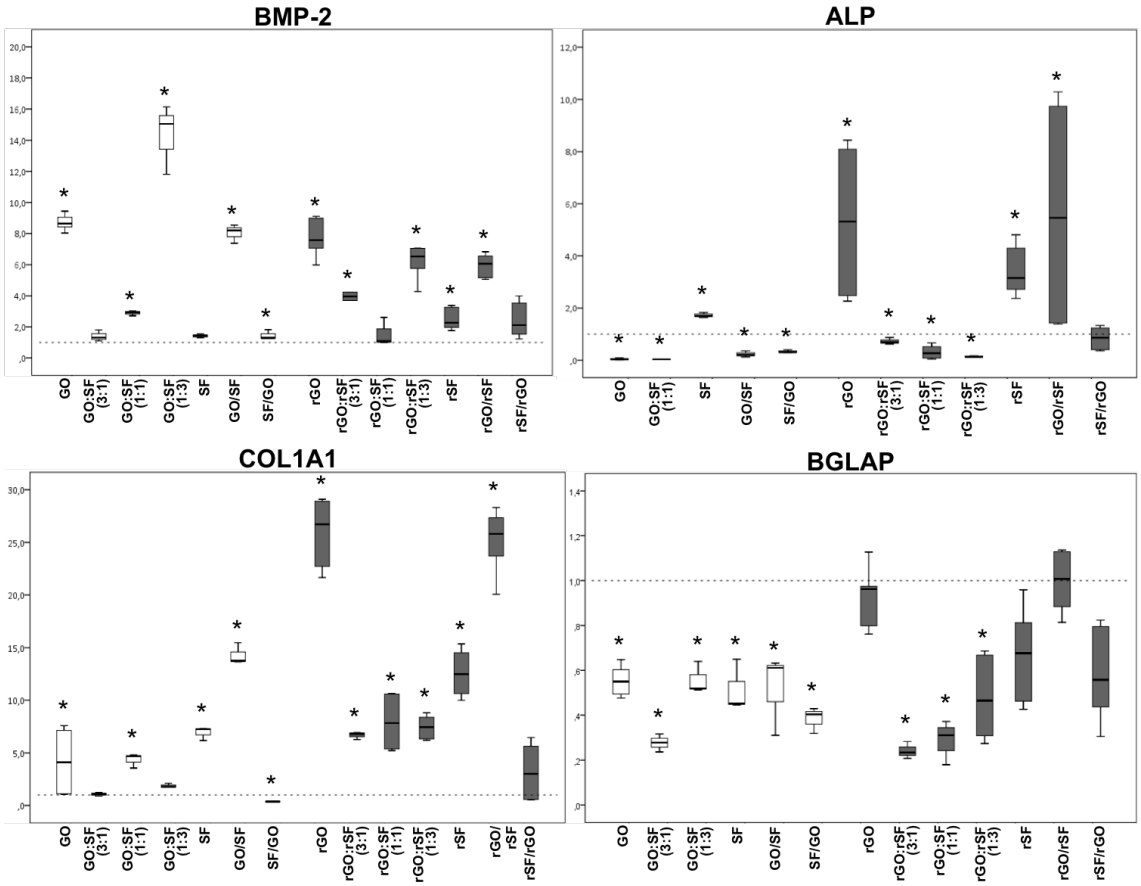

Figura 33. Expresión relativa de BMP-2, ALP, COL1A1 y BGLAP por parte de las hPDLSCs tras 10 días en cultivo sobre los distintos *films* en su versión oxidada (cajas blancas) y reducida (cajas grises). El asterisco indica significación estadística ($p<0,05$).

En esta investigación, se han demostrado los beneficios de combinar distintas configuraciones de GO y SF en la diferenciación de hPDLSCs a células cementoblásticas con una tasa de proliferación moderada. Tal y como publicaron Kapinas y col., las células madre suprimen los genes relacionados con la diferenciación celular mientras se encuentran en fase de auto-propagación (284). De acuerdo con esto, se hace necesario encontrar un equilibrio entre tasas de proliferación y grado de diferenciación durante el cultivo de los *scaffolds* con las células de origen mesenquimal. Tras 10 días en cultivo, los *films* integrados por GO puro y la proporción rGO:rSF(1:3) obtuvieron excelentes resultados de proliferación pero ningún perfil claro de diferenciación (Fig. 28). Sin embargo, los *films* compuestos por la configuración pura de rGO y la bicapa integrada por rGO/rSF parecen inducir con éxito la diferenciación de hPDLSCs a cementoblastos mostrando una tasa de

proliferación moderada (Fig. 27). Si nos fijamos más detalladamente en los resultados obtenidos, el perfil de expresión génica mostrado por ambos materiales se ajusta mejor a una diferenciación cementoblástica en el caso de la bicapa rGO/rSF debido a que PTPLA/CAP se ve significativamente disminuido, no siendo esta reducción significativa en el caso de rGO. Esta ligera mejora en el perfil de expresión del *film* de rGO/rSF podría estar relacionada con la microtopografía mostrada por este material (Fig. 23), como apuntan Dalby y col. en su trabajo sobre el control que ejercen la simetría y el desorden a escala nanométrica sobre la diferenciación de hMSCs (285).

A la luz de lo anteriormente expuesto, y teniendo en cuenta la dificultad inherente de manipular los *films* de rGO puro y su poca aplicabilidad práctica, el biomaterial formado por la bicapa rGO/rSF se plantea como el más adecuado de cara a futuros experimentos relacionados con ingeniería de tejidos en odontología.

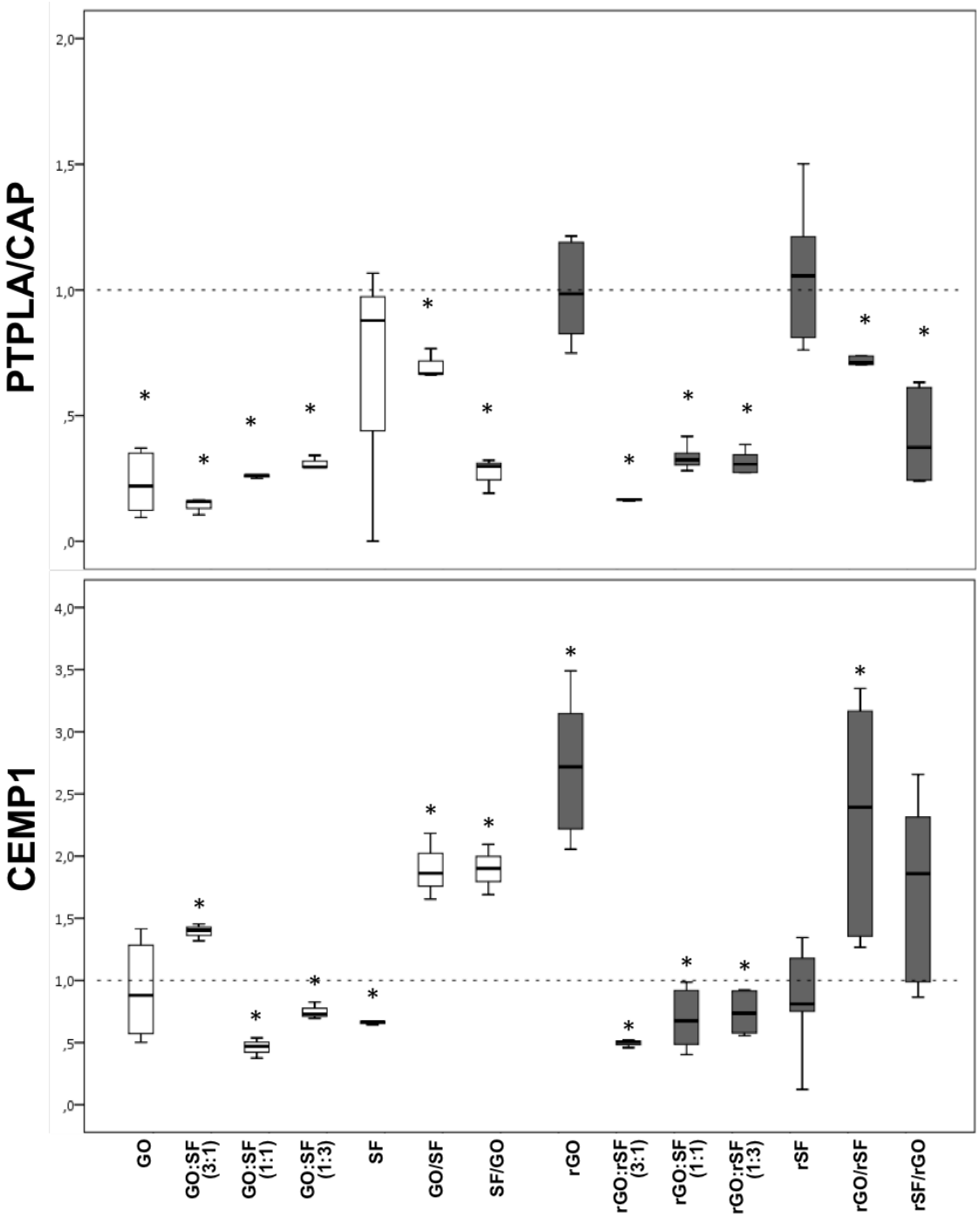

Figura 34. Expresión relativa de PTPLA/CAP y CEMP1 por parte de las hPDLSCs tras 10 días en cultivo sobre distintos los distintos *films* en su versión oxidada (cajas blancas) y reducida (cajas grises). El asterisco indica significación estadística ($p<0,05$).

5. CONCLUSIONES

1. La forma en que se disponen y mezclan SF y GO en la elaboración de los biomateriales como *scaffolds* 2D condiciona la topografía de los *films*. Esto ha dado como resultado la obtención de superficies con distinto grado de rugosidad, habiéndose observado desde superficies prácticamente lisas hasta superficies con características similares a un *scaffold* 3D.

2. En la mayoría de los *films* se observa la morfología fusiforme típica que muestran las hPDLSCs en cultivo de mantenimiento. Esta morfología se ve afectada al crecer en contacto directo con una superficie de fibroína pura, perdiendo la silueta fusiforme que sí se observa en el resto de configuraciones.

3. Tras 10 días en cultivo, la mayor tasa de proliferación de las hPDLSCs se alcanza, indistintamente, sobre los *films* de GO puro y la mezcla rGO:rSF(1:3). Sin embargo, sobre los *films* híbridos se observa la tendencia de una mayor proliferación en las formas reducidas que en las oxidadas.

4. Todos los *films* elaborados han resultados altamente biocompatibles en cultivos con hPDLSCs, obteniendo en todos los casos una viabilidad superior al 95% después de 10 días en cultivo.

5. Las hPDLSCs cultivadas durante 10 días muestran mayoritariamente una desregulación significativa de la expresión de marcadores mesenquimales (CD73, CD90 y CD105), principalmente cuando los materiales contenían rGO en su composición, lo que sugiere que se encuentren en un proceso de diferenciación.

6. El perfil de expresión génica de las hPDLSCs y la observación de depósitos de calcio tras su cultivo durante 10 días en el medio de inducción osteogénico Osteodiff®, indican que las hPDLSCs tienen plasticidad fenotípica y capacidad para diferenciarse a cementoblastos o a osteoblastos funcionales.

7. Se han hallado dos *films* sobre los que se obtiene una proliferación moderada, la configuración pura de rGO y la bicapa rGO/rSF, capaces de inducir, tras 10 días en cultivo, la diferenciación de hPDLSCs hacia células cementoblásticas sin la necesidad de añadir ninguna molécula inductora de este tipo de diferenciación.

8. De entre las configuraciones estudiadas, la bicapa rGO/rSF sería el *film* de elección (para continuar la línea de investigación de aplicaciones eventuales en terapia celular periodontal) al hallar un equilibrio entre consistencia del biomaterial, morfología, proliferación, viabilidad, perfil mesenquimal y capacidad diferenciadora de las hPDLSCs.

6. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. O'Brien, Fergal J. Biomaterials and scaffolds for tissue engineering. Mater Today. 2011;14(3):88-95.

2. Dieckmann C, Renner R, Milkova L, Simon JC. Regenerative medicine in dermatology: biomaterials, tissue engineering, stem cells, gene transfer and beyond. Exp Dermatol. 2010;19(8):697-706.

3. Calvo Santo-Rosa, Alejandro. Análisis y simulación numérica del proceso de biodegradación por hidrólisis de biopolímeros en aplicaciones médicas. [Proyecto fin de carrera]. [Sevilla]: Universidad de Sevilla; 2013.

4. Groth, T. Biomateriales y biocompatibilidad. Visión general: definición del concepto, aplicación y análisis. Quintessence Téc. 2006;17(7):392-7.

5. Universidad de Valencia. Los polímeros en Medicina [Internet]. Recuperado a partir de: http://www.eis.uva.es/~macromol/curso05-06/medicina/principal.htm

6. María Vallet Regí. Biomateriales para sustitución y reparación de tejidos. [Internet]. Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.; Recuperado a partir de: http://www.aecientificos.es/empresas/aecientificos/documentos/Biomateriales.pdf

7. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. Science. 1993;260(5110):920-6.

8. periodontal tissue engineering [Internet]. [citado 17 de julio de 2015]. Recuperado a partir de: http://www.den.hokudai.ac.jp/hozon2/biomater.html

9. Líneas de investigación [Internet]. [citado 14 de julio de 2015]. Recuperado a partir de: http://www.upv.es/cb/investigacion/lineas-es.html

10. Bossù M, Pacifici A, Carbone D, Tenore G, Ierardo G, Pacifici L, et al. Today prospects for tissue engineering therapeutic approach in dentistry. ScientificWorldJournal. 2014;2014:151252.

11. Katari RS, Peloso A, Orlando G. Tissue engineering. Adv Surg. 2014;48:137-54.

12. Pennesi G, Scaglione S, Giannoni P, Quarto R. Regulatory influence of scaffolds on cell behavior: how cells decode biomaterials. Curr Pharm Biotechnol. 2011;12(2):151-9.

13. Wu S-Y, An SSA, Hulme J. Current applications of graphene oxide in nanomedicine. Int J Nanomedicine. 2015;10:9-24.

14. Abou Neel EA, Chrzanowski W, Salih VM, Kim H-W, Knowles JC. Tissue engineering in dentistry. J Dent. 2014;42(8):915-28.

15. Kundu B, Rajkhowa R, Kundu SC, Wang X. Silk fibroin biomaterials for

tissue regenerations. Adv Drug Deliv Rev. 2013;65(4):457-70.

16. Wang X, Kim HJ, Xu P, Matsumoto A, Kaplan DL. Biomaterial coatings by stepwise deposition of silk fibroin. Langmuir ACS J Surf Colloids. 2005;21(24):11335-41.

17. Vepari C, Kaplan DL. Silk as a Biomaterial. Prog Polym Sci. 2007;32(8-9):991-1007.

18. Sobajo C, Behzad F, Yuan X-F, Bayat A. Silk: a potential medium for tissue engineering. Eplasty. 2008;8:e47.

19. Altman GH, Diaz F, Jakuba C, Calabro T, Horan RL, Chen J, et al. Silk-based biomaterials. Biomaterials. 2003;24(3):401-16.

20. Ayoub NA, Garb JE, Tinghitella RM, Collin MA, Hayashi CY. Blueprint for a high-performance biomaterial: full-length spider dragline silk genes. PloS One. 2007;2(6):e514.

21. Omenetto FG, Kaplan DL. New opportunities for an ancient material. Science. 2010;329(5991):528-31.

22. Zhou CZ, Confalonieri F, Medina N, Zivanovic Y, Esnault C, Yang T, et al. Fine organization of Bombyx mori fibroin heavy chain gene. Nucleic Acids Res. 2000;28(12):2413-9.

23. Tanaka K, Inoue S, Mizuno S. Hydrophobic interaction of P25, containing Asn-linked oligosaccharide chains, with the H-L complex of silk fibroin produced by Bombyx mori. Insect Biochem Mol Biol. 1999;29(3):269-76.

24. Inoue S, Tanaka K, Arisaka F, Kimura S, Ohtomo K, Mizuno S. Silk fibroin of Bombyx mori is secreted, assembling a high molecular mass elementary unit consisting of H-chain, L-chain, and P25, with a 6:6:1 molar ratio. J Biol Chem. 2000;275(51):40517-28.

25. María de los Ángeles García Pérez. Elaboración de mallas electrohiladas de fibroína de seda con óxido de grafeno y evaluación de su biocompatibilidad con la línea celular L929. Estudio preliminar. [Murcia]: Universidad de Murcia. Facultad de Veterinaria.; 2014.

26. Kaplan DL, Mello CM, Arcidiacono S, Fossey S, Senecal K, Muller W. Protein based materials. Boston: Birkhauser: Mc Grath K, Kaplan DL, editors; 1998.

27. Zhou CZ, Confalonieri F, Jacquet M, Perasso R, Li ZG, Janin J. Silk fibroin: structural implications of a remarkable amino acid sequence. Proteins. 2001;44(2):119-22.

28. Cao Y, Wang B. Biodegradation of silk biomaterials. Int J Mol Sci. 2009;10(4):1514-24.

29. Silk Fibroin [Internet]. [citado 16 de julio de 2015]. Recuperado a partir de: https://www3.nd.edu/~aseriann/silk.html

30. Salvador David Aznar Cervantes. El gusano de seda, Bombyx mori (Linneo, 1758) (Lepidoptera: Bombicidae) como plataforma de producción de proteínas naturales y recombinantes. [Murcia]: Universidad de Murcia. Aplicaciones en Biotecnología e Ingeniería de tejidos.; 2013.

31. Ki CS, Park YH, Jin H-J. Silk protein as a fascinating biomedical polymer: Structural fundamentals and applications. Macromol Res. 2009;17(12):935-42.

32. Min B-M, Jeong L, Lee KY, Park WH. Regenerated silk fibroin nanofibers: water vapor-induced structural changes and their effects on the behavior of normal human cells. Macromol Biosci. 2006;6(4):285-92.

33. Panilaitis B, Altman GH, Chen J, Jin H-J, Karageorgiou V, Kaplan DL. Macrophage responses to silk. Biomaterials. 2003;24(18):3079-85.

34. Santin M, Motta A, Freddi G, Cannas M. In vitro evaluation of the inflammatory potential of the silk fibroin. J Biomed Mater Res. 1999;46(3):382-9.

35. Meinel L, Hofmann S, Karageorgiou V, Kirker-Head C, McCool J, Gronowicz G, et al. The inflammatory responses to silk films in vitro and in vivo. Biomaterials. 2005;26(2):147-55.

36. Gellynck K, Verdonk PCM, Van Nimmen E, Almqvist KF, Gheysens T, Schoukens G, et al. Silkworm and spider silk scaffolds for chondrocyte support. J Mater Sci Mater Med. 2008;19(11):3399-409.

37. Lundmark K, Westermark GT, Olsén A, Westermark P. Protein fibrils in nature can enhance amyloid protein A amyloidosis in mice: Cross-seeding as a disease mechanism. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102(17):6098-102.

38. Rajkhowa R, Gupta VB, Kothari VK. Tensile stress–strain and recovery behavior of Indian silk fibers and their structural dependence. J Appl Polym Sci. 2000;77(11):2418-29.

39. Rajkhowa R, Levin B, Redmond SL, Li LH, Wang L, Kanwar JR, et al. Structure and properties of biomedical films prepared from aqueous and acidic silk fibroin solutions. J Biomed Mater Res A. 2011;97(1):37-45.

40. Altman GH, Horan RL, Lu HH, Moreau J, Martin I, Richmond JC, et al. Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligaments. Biomaterials. 2002;23(20):4131-41.

41. Ha S-W, Tonelli AE, Hudson SM. Structural studies of Bombyx mori silk fibroin during regeneration from solutions and wet fiber spinning. Biomacromolecules. 2005;6(3):1722-31.

42. Jiang C, Wang X, Gunawidjaja R, Lin Y-H, Gupta MK, Kaplan DL, et al. Mechanical Properties of Robust Ultrathin Silk Fibroin Films. Adv Funct Mater. 2007;17(13):2229-37.

43. Vert M, Li SM, Spenlehauer G, Guerin P. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. J Mater Sci Mater Med. 1992;3(6):432-46.

44. Hu Y, Zhang Q, You R, Wang L, Li M. The Relationship between Secondary Structure and Biodegradation Behavior of Silk Fibroin Scaffolds. Adv Mater Sci Eng. 2012;2012:e185905.

45. Wang Y, Rudym DD, Walsh A, Abrahamsen L, Kim H-J, Kim HS, et al. In vivo degradation of three-dimensional silk fibroin scaffolds. Biomaterials. 2008;29(24-25):3415-28.

46. Sengupta S, Park S-H, Seok GE, Patel A, Numata K, Lu C-L, et al. Quantifying osteogenic cell degradation of silk biomaterials. Biomacromolecules. 2010;11(12):3592-9.

47. Daley WP, Peters SB, Larsen M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. J Cell Sci. 2008;121(Pt 3):255-64.

48. Nair LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials. Prog Polym Sci. 2007;32(8–9):762-98.

49. Murphy AR, Kaplan DL. Biomedical applications of chemically-modified silk fibroin. J Mater Chem. 2009;19(36):6443-50.

50. Karageorgiou V, Meinel L, Hofmann S, Malhotra A, Volloch V, Kaplan D. Bone morphogenetic protein-2 decorated silk fibroin films induce osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. J Biomed Mater Res A. 2004;71(3):528-37.

51. Karageorgiou V, Tomkins M, Fajardo R, Meinel L, Snyder B, Wade K, et al. Porous silk fibroin 3-D scaffolds for delivery of bone morphogenetic protein-2 in vitro and in vivo. J Biomed Mater Res A. 2006;78(2):324-34.

52. Zhang Y-Q, Ma Y, Xia Y-Y, Shen W-D, Mao J-P, Zha X-M, et al. Synthesis of silk fibroin-insulin bioconjugates and their characterization and activities in vivo. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2006;79B(2):275-83.

53. Hai-Bo Yan Y-QZ. Biosynthesis of insulin-silk fibroin nanoparticles conjugates and in vitro evaluation of a drug delivery system. J Nanoparticle Res. 2008;11(8):1937-46.

54. Zainuddin null, Le TT, Park Y, Chirila TV, Halley PJ, Whittaker AK. The behavior of aged regenerated Bombyx mori silk fibroin solutions studied by (1)H NMR and rheology. Biomaterials. 2008;29(32):4268-74.

55. Rockwood DN, Preda RC, Yücel T, Wang X, Lovett ML, Kaplan DL. Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin. Nat Protoc. 2011;6(10):1612-31.

56. Song JJ, Ott HC. Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds. Trends Mol Med. 2011;17(8):424-32.

57. Haider M, Leung V, Ferrari F, Crissman J, Powell J, Cappello J, et al. Molecular engineering of silk-elastinlike polymers for matrix-mediated gene delivery: biosynthesis and characterization. Mol Pharm. 2005;2(2):139-50.

58. Li M, Wu Z, Zhang C, Lu S, Yan H, Huang D, et al. Study on porous silk

fibroin materials. II. Preparation and characteristics of spongy porous silk fibroin materials. J Appl Polym Sci. 2001;79(12):2192-9.

59. Tsukada M, Freddi G, Minoura N, Allara G. Preparation and application of porous silk fibroin materials. J Appl Polym Sci. 1994;54(4):507-14.

60. Harris LD, Kim BS, Mooney DJ. Open pore biodegradable matrices formed with gas foaming. J Biomed Mater Res. 1998;42(3):396-402.

61. Meinel L, Fajardo R, Hofmann S, Langer R, Chen J, Snyder B, et al. Silk implants for the healing of critical size bone defects. Bone. 2005;37(5):688-98.

62. Seregin VV, Coffer JL. Biomineralization of calcium disilicide in porous polycaprolactone scaffolds. Biomaterials. 2006;27(27):4745-54.

63. Hokugo A, Takamoto T, Tabata Y. Preparation of hybrid scaffold from fibrin and biodegradable polymer fiber. Biomaterials. 2006;27(1):61-7.

64. Wang M. Developing bioactive composite materials for tissue replacement. Biomaterials. 2003;24(13):2133-51.

65. Mandal BB, Grinberg A, Seok Gil E, Panilaitis B, Kaplan DL. High-strength silk protein scaffolds for bone repair. Proc Natl Acad Sci USA. 2012;109(20):7699-704.

66. Fan H, Liu H, Wong EJW, Toh SL, Goh JCH. In vivo study of anterior cruciate ligament regeneration using mesenchymal stem cells and silk scaffold. Biomaterials. 2008;29(23):3324-37.

67. Um IC, Kweon HY, Park YH, Hudson S. Structural characteristics and properties of the regenerated silk fibroin prepared from formic acid. Int J Biol Macromol. 2001;29(2):91-7.

68. Gupta MK, Khokhar SK, Phillips DM, Sowards LA, Drummy LF, Kadakia MP, et al. Patterned Silk Films Cast from Ionic Liquid Solubilized Fibroin as Scaffolds for Cell Growth. Langmuir. 2007;23(3):1315-9.

69. Higuchi A, Takanashi Y, Ohno T, Asakura T, Cho C-S, Akaike T, et al. Production of interferon-β by fibroblast cells on membranes prepared by extracellular matrix proteins. Cytotechnology. 2002;39(3):131-7.

70. Lu Q, Hu X, Wang X, Kluge JA, Lu S, Cebe P, et al. Water-Insoluble Silk Films with Silk I Structure. Acta Biomater. 2010;6(4):1380-7.

71. Zhang X, Reagan MR, Kaplan DL. Electrospun Silk Biomaterial Scaffolds for Regenerative Medicine. Adv Drug Deliv Rev. 2009;61(12):988-1006.

72. Tao H, Kaplan DL, Omenetto FG. Silk Materials – A Road to Sustainable High Technology. Adv Mater. 2012;24(21):2824-37.

73. Lawrence BD, Pan Z, Weber MD, Kaplan DL, Rosenblatt MI. Silk film culture system for in vitro analysis and biomaterial design. J Vis Exp JoVE. 2012;(62).

74. Bondar B, Fuchs S, Motta A, Migliaresi C, Kirkpatrick CJ. Functionality of

endothelial cells on silk fibroin nets: comparative study of micro- and nanometric fibre size. Biomaterials. 2008;29(5):561-72.

75. Unger RE, Peters K, Wolf M, Motta A, Migliaresi C, Kirkpatrick CJ. Endothelialization of a non-woven silk fibroin net for use in tissue engineering: growth and gene regulation of human endothelial cells. Biomaterials. 2004;25(21):5137-46.

76. Zhang X, Wang X, Keshav V, Wang X, Johanas JT, Leisk GG, et al. Dynamic culture conditions to generate silk-based tissue-engineered vascular grafts. Biomaterials. 2009;30(19):3213-23.

77. Liu H, Li X, Zhou G, Fan H, Fan Y. Electrospun sulfated silk fibroin nanofibrous scaffolds for vascular tissue engineering. Biomaterials. 2011;32(15):3784-93.

78. Yang Y, Chen X, Ding F, Zhang P, Liu J, Gu X. Biocompatibility evaluation of silk fibroin with peripheral nerve tissues and cells in vitro. Biomaterials. 2007;28(9):1643-52.

79. Yang Y, Ding F, Wu J, Hu W, Liu W, Liu J, et al. Development and evaluation of silk fibroin-based nerve grafts used for peripheral nerve regeneration. Biomaterials. 2007;28(36):5526-35.

80. Wei Y, Gong K, Zheng Z, Wang A, Ao Q, Gong Y, et al. Chitosan/silk fibroin-based tissue-engineered graft seeded with adipose-derived stem cells enhances nerve regeneration in a rat model. J Mater Sci Mater Med. 2011;22(8):1947-64.

81. Wang C-Y, Zhang K-H, Fan C-Y, Mo X-M, Ruan H-J, Li F-F. Aligned natural-synthetic polyblend nanofibers for peripheral nerve regeneration. Acta Biomater. 2011;7(2):634-43.

82. Huang W, Begum R, Barber T, Ibba V, Tee NCH, Hussain M, et al. Regenerative potential of silk conduits in repair of peripheral nerve injury in adult rats. Biomaterials. 2012;33(1):59-71.

83. Madduri S, Papaloïzos M, Gander B. Trophically and topographically functionalized silk fibroin nerve conduits for guided peripheral nerve regeneration. Biomaterials. 2010;31(8):2323-34.

84. Yoo CR, Yeo I-S, Park KE, Park JH, Lee SJ, Park WH, et al. Effect of chitin/silk fibroin nanofibrous bicomponent structures on interaction with human epidermal keratinocytes. Int J Biol Macromol. 2008;42(4):324-34.

85. Yeo I-S, Oh J-E, Jeong L, Lee TS, Lee SJ, Park WH, et al. Collagen-based biomimetic nanofibrous scaffolds: preparation and characterization of collagen/silk fibroin bicomponent nanofibrous structures. Biomacromolecules. 2008;9(4):1106-16.

86. Khor HL, Ng KW, Htay AS, Schantz J-T, Teoh SH, Hutmacher DW. Preliminary study of a polycaprolactone membrane utilized as epidermal substrate. J Mater Sci Mater Med. 2003;14(2):113-20.

87. Roh D-H, Kang S-Y, Kim J-Y, Kwon Y-B, Young Kweon H, Lee K-G, et al. Wound healing effect of silk fibroin/alginate-blended sponge in full thickness skin defect of rat. J Mater Sci Mater Med. 2006;17(6):547-52.

88. Kasoju N, Bora U. Silk fibroin in tissue engineering. Adv Healthc Mater. 2012;1(4):393-412.

89. Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. Science. 2002;295(5557):1009-14.

90. Meinel L, Betz O, Fajardo R, Hofmann S, Nazarian A, Cory E, et al. Silk based biomaterials to heal critical sized femur defects. Bone. 2006;39(4):922-31.

91. Li C, Vepari C, Jin H-J, Kim HJ, Kaplan DL. Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials. 2006;27(16):3115-24.

92. Wang G, Yang H, Li M, Lu S, Chen X, Cai X. The use of silk fibroin/hydroxyapatite composite co-cultured with rabbit bone-marrow stromal cells in the healing of a segmental bone defect. J Bone Joint Surg Br. 2010;92(2):320-5.

93. Kweon H, Lee K-G, Chae C-H, Balázsi C, Min S-K, Kim J-Y, et al. Development of nano-hydroxyapatite graft with silk fibroin scaffold as a new bone substitute. J Oral Maxillofac Surg Off J Am Assoc Oral Maxillofac Surg. 2011;69(6):1578-86.

94. Tanaka K, Kajiyama N, Ishikura K, Waga S, Kikuchi A, Ohtomo K, et al. Determination of the site of disulfide linkage between heavy and light chains of silk fibroin produced by Bombyx mori. Biochim Biophys Acta. 1999;1432(1):92-103.

95. Motta A, Migliaresi C, Faccioni F, Torricelli P, Fini M, Giardino R. Fibroin hydrogels for biomedical applications: preparation, characterization and in vitro cell culture studies. J Biomater Sci Polym Ed. 2004;15(7):851-64.

96. Fini M, Motta A, Torricelli P, Giavaresi G, Nicoli Aldini N, Tschon M, et al. The healing of confined critical size cancellous defects in the presence of silk fibroin hydrogel. Biomaterials. 2005;26(17):3527-36.

97. Kim HJ, Kim U-J, Kim HS, Li C, Wada M, Leisk GG, et al. Bone tissue engineering with premineralized silk scaffolds. Bone. 2008;42(6):1226-34.

98. Ghanaati S, Unger RE, Webber MJ, Barbeck M, Orth C, Kirkpatrick JA, et al. Scaffold vascularization in vivo driven by primary human osteoblasts in concert with host inflammatory cells. Biomaterials. 2011;32(32):8150-60.

99. Unger RE, Sartoris A, Peters K, Motta A, Migliaresi C, Kunkel M, et al. Tissue-like self-assembly in cocultures of endothelial cells and osteoblasts and the formation of microcapillary-like structures on three-dimensional porous biomaterials. Biomaterials. 2007;28(27):3965-76.

100. Fuchs S, Jiang X, Schmidt H, Dohle E, Ghanaati S, Orth C, et al. Dynamic processes involved in the pre-vascularization of silk fibroin constructs

for bone regeneration using outgrowth endothelial cells. Biomaterials. 2009;30(7):1329-38.

101. Unger RE, Ghanaati S, Orth C, Sartoris A, Barbeck M, Halstenberg S, et al. The rapid anastomosis between prevascularized networks on silk fibroin scaffolds generated in vitro with cocultures of human microvascular endothelial and osteoblast cells and the host vasculature. Biomaterials. 2010;31(27):6959-67.

102. Wang Y, Blasioli DJ, Kim H-J, Kim HS, Kaplan DL. Cartilage tissue engineering with silk scaffolds and human articular chondrocytes. Biomaterials. 2006;27(25):4434-42.

103. Morita Y, Tomita N, Aoki H, Sonobe M, Wakitani S, Tamada Y, et al. Frictional properties of regenerated cartilage in vitro. J Biomech. 2006;39(1):103-9.

104. Wang Y, Kim U-J, Blasioli DJ, Kim H-J, Kaplan DL. In vitro cartilage tissue engineering with 3D porous aqueous-derived silk scaffolds and mesenchymal stem cells. Biomaterials. 2005;26(34):7082-94.

105. Baek HS, Park YH, Ki CS, Park J-C, Rah DK. Enhanced chondrogenic responses of articular chondrocytes onto porous silk fibroin scaffolds treated with microwave-induced argon plasma. Surf Coat Technol. 2008;202(22-23):5794-7.

106. Bhardwaj N, Nguyen QT, Chen AC, Kaplan DL, Sah RL, Kundu SC. Potential of 3-D tissue constructs engineered from bovine chondrocytes / silk fibroin-chitosan for in vitro cartilage tissue engineering. Biomaterials. 2011;32(25):5773-81.

107. Silva SS, Motta A, Rodrigues MT, Pinheiro AFM, Gomes ME, Mano JF, et al. Novel genipin-cross-linked chitosan/silk fibroin sponges for cartilage engineering strategies. Biomacromolecules. 2008;9(10):2764-74.

108. Uebersax L, Merkle HP, Meinel L. Insulin-like growth factor I releasing silk fibroin scaffolds induce chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. J Control Release Off J Control Release Soc. 2008;127(1):12-21.

109. Shangkai C, Naohide T, Koji Y, Yasuji H, Masaaki N, Tomohiro T, et al. Transplantation of allogeneic chondrocytes cultured in fibroin sponge and stirring chamber to promote cartilage regeneration. Tissue Eng. 2007;13(3):483-92.

110. Seda Tigli R, Ghosh S, Laha MM, Shevde NK, Daheron L, Gimble J, et al. Comparative chondrogenesis of human cell sources in 3D scaffolds. J Tissue Eng Regen Med. 2009;3(5):348-60.

111. Hairfield-Stein M, England C, Paek HJ, Gilbraith KB, Dennis R, Boland E, et al. Development of self-assembled, tissue-engineered ligament from bone marrow stromal cells. Tissue Eng. 2007;13(4):703-10.

112. Yang M-C, Wang S-S, Chou N-K, Chi N-H, Huang Y-Y, Chang Y-L, et al. The cardiomyogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells on silk

fibroin-polysaccharide cardiac patches in vitro. Biomaterials. 2009;30(22):3757-65.

113. Liu W, Merrett K, Griffith M, Fagerholm P, Dravida S, Heyne B, et al. Recombinant human collagen for tissue engineered corneal substitutes. Biomaterials. 2008;29(9):1147-58.

114. Lawrence BD, Cronin-Golomb M, Georgakoudi I, Kaplan DL, Omenetto FG. Bioactive silk protein biomaterial systems for optical devices. Biomacromolecules. abril de 2008;9(4):1214-20.

115. Yang, T., Zhang, M. Biocompatibility of silk fibroin membrane as tissue engineering corneal scaffold. Int J Ophthalmol. 2008;8:1557-9.

116. Madden PW, Lai JNX, George KA, Giovenco T, Harkin DG, Chirila TV. Human corneal endothelial cell growth on a silk fibroin membrane. Biomaterials. 2011;32(17):4076-84.

117. Bray LJ, George KA, Ainscough SL, Hutmacher DW, Chirila TV, Harkin DG. Human corneal epithelial equivalents constructed on Bombyx mori silk fibroin membranes. Biomaterials. 2011;32(22):5086-91.

118. Gotoh Y, Niimi S, Hayakawa T, Miyashita T. Preparation of lactose-silk fibroin conjugates and their application as a scaffold for hepatocyte attachment. Biomaterials. 2004;25(6):1131-40.

119. Cirillo B, Morra M, Catapano G. Adhesion and function of rat liver cells adherent to silk fibroin/collagen blend films. Int J Artif Organs. 2004;27(1):60-8.

120. K. Hu QL. Biocompatible Fibroin Blended Films with Recombinant Humanlike Collagen for Hepatic Tissue Engineering. J Bioact Compat Polym - J BIOACT COMPAT POLYM. 2006;21(1):23-37.

121. Lu Q, Zhang S, Hu K, Feng Q, Cao C, Cui F. Cytocompatibility and blood compatibility of multifunctional fibroin/collagen/heparin scaffolds. Biomaterials. 2007;28(14):2306-13.

122. Qiang Lv KH. Preparation and characterization of PLA/fibroin composite and culture of HepG2 (human hepatocellular liver carcinoma cell line) cells. Compos Sci Technol. 2007;67(14):3023-30.

123. She Z, Liu W, Feng Q. Self-assembly model, hepatocytes attachment and inflammatory response for silk fibroin/chitosan scaffolds. Biomed Mater Bristol Engl. 2009;4(4):045014.

124. Qian Y, Shen Y, Lu Z, Fan Z, Liu T, Zhang J, et al. [Biocompatibility of silk fibroin nanofibers scaffold with olfactory ensheathing cells]. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi Zhongguo Xiufu Chongjian Waike Zazhi Chin J Reparative Reconstr Surg. 2009;23(11):1365-70.

125. Shen Y, Qian Y, Zhang H, Zuo B, Lu Z, Fan Z, et al. Guidance of olfactory ensheathing cell growth and migration on electrospun silk fibroin scaffolds. Cell Transplant. 2010;19(2):147-57.

126. Chang G, Kim H-J, Kaplan D, Vunjak-Novakovic G, Kandel RA. Porous silk scaffolds can be used for tissue engineering annulus fibrosus. Eur Spine J Off Publ Eur Spine Soc Eur Spinal Deform Soc Eur Sect Cerv Spine Res Soc. 2007;16(11):1848-57.

127. Chang G, Kim HJ, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL, Kandel R. Enhancing annulus fibrosus tissue formation in porous silk scaffolds. J Biomed Mater Res A. 2010;92(1):43-51.

128. Atala A. Tissue engineering of human bladder. Br Med Bull. 2011;97:81-104.

129. Liu C, Liao Y, Li H, Zheng S. [Cytocompatibility of silk fibroin film with rabbit urinary bladder transitional epithelial cells in vitro]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao. 2008;28(2):216-8.

130. Liu C-X, Lin Y-Y, Li H-L, Zheng S-B. [Application of silk fibroin film for repairing rabbit urethral defect]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao. 2007;27(2):184-7.

131. Cannon GM, Mauney JR, Gong EM, Yu RN, Adam RM, Estrada CR. Silk as a Novel Biomaterial in Bladder Tissue Engineering. J Pediatr Urol. 2010;6:S82.

132. Mauney JR, Cannon GM, Lovett ML, Gong EM, Di Vizio D, Gomez P, et al. Evaluation of gel spun silk-based biomaterials in a murine model of bladder augmentation. Biomaterials. 2011;32(3):808-18.

133. Zou XH, Zhi YL, Chen X, Jin HM, Wang LL, Jiang YZ, et al. Mesenchymal stem cell seeded knitted silk sling for the treatment of stress urinary incontinence. Biomaterials. 2010;31(18):4872-9.

134. Levin B, Rajkhowa R, Redmond SL, Atlas MD. Grafts in myringoplasty: utilizing a silk fibroin scaffold as a novel device. Expert Rev Med Devices. 2009;6(6):653-64.

135. Levin B, Redmond SL, Rajkhowa R, Eikelboom RH, Marano RJ, Atlas MD. Preliminary results of the application of a silk fibroin scaffold to otology. Otolaryngol--Head Neck Surg Off J Am Acad Otolaryngol-Head Neck Surg. 2010;142(3 Suppl 1):S33-5.

136. Ghassemifar R, Redmond S, Zainuddin null, Chirila TV. Advancing towards a tissue-engineered tympanic membrane: silk fibroin as a substratum for growing human eardrum keratinocytes. J Biomater Appl. 2010;24(7):591-606.

137. Galler KM, D'Souza RN. Tissue engineering approaches for regenerative dentistry. Regen Med. 2011;6(1):111-24.

138. Galler KM, D'Souza RN, Hartgerink JD. Biomaterials and their potential applications for dental tissue engineering. J Mater Chem. 2010;20(40):8730-46.

139. Xu W-P, Zhang W, Asrican R, Kim H-J, Kaplan DL, Yelick PC. Accurately shaped tooth bud cell-derived mineralized tissue formation on silk scaffolds.

Tissue Eng Part A. 2008;14(4):549-57.

140. Zhang W, Ahluwalia IP, Literman R, Kaplan DL, Yelick PC. Human dental pulp progenitor cell behavior on aqueous and hexafluoroisopropanol based silk scaffolds. J Biomed Mater Res A. 2011;97(4):414-22.

141. Sahoo NG, Pan Y, Li L, Chan SH. Graphene-based materials for energy conversion. Adv Mater Deerfield Beach Fla. 2012;24(30):4203-10.

142. Vanessa García Marínez. Estudio de la estabilidad del óxido de grafeno con el tiempo. [Trabajo Fin de Máster]. Universidad de Oviedo, Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica; 2013.

143. Novoselov KS, Jiang D, Schedin F, Booth TJ, Khotkevich VV, Morozov SV, et al. Two-dimensional atomic crystals. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(30):10451-3.

144. Rodríguez González, Claramaría, Oxana Vasilievna Kharissova. Propiedades y aplicaciones del grafeno. Ingenierías. 2008;11(38):17-23.

145. Juan Carlos García Gallegos. Sistemas híbridos de polianilina y nanestructuras de carbono para su aplicación en músculos artificiales y supercondensadores. [Alicante]: Universidad de Alicante; 2012.

146. Chen D, Feng H, Li J. Graphene oxide: preparation, functionalization, and electrochemical applications. Chem Rev. 2012;112(11):6027-53.

147. Zhang M, Parajuli RR, Mastrogiovanni D, Dai B, Lo P, Cheung W, et al. Production of graphene sheets by direct dispersion with aromatic healing agents. Small Weinh Bergstr Ger. 21 de mayo de 2010;6(10):1100-7.

148. Pérez Mas, Ana Matilde. Influencia de la etapa de exfoliación en el proceso de obtención de óxidos de grafeno a partir de diferentes grafitos. [Tesis Fin de Master]. [Oviedo]: Universidad de Oviedo, Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica; 2013.

149. Chua CK, Pumera M. Chemical reduction of graphene oxide: a synthetic chemistry viewpoint. Chem Soc Rev. 2013;43(1):291-312.

150. Thakur S, Karak N. Alternative methods and nature-based reagents for the reduction of graphene oxide: A review. Carbon. 2015;94:224-42.

151. Pei S, Cheng H-M. The reduction of graphene oxide. Carbon. 2012;50(9):3210-28.

152. Bressan E, Ferroni L, Gardin C, Sbricoli L, Gobbato L, Ludovichetti FS, et al. Graphene based scaffolds effects on stem cells commitment. J Transl Med. 2014;12(1):296.

153. Goenka S, Sant V, Sant S. Graphene-based nanomaterials for drug delivery and tissue engineering. J Control Release Off J Control Release Soc. 2014;173:75-88.

154. Stone V, Johnston H, Schins RPF. Development of in vitro systems for

nanotoxicology: methodological considerations. Crit Rev Toxicol. 2009;39(7):613-26.

155. Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. Environ Health Perspect. 2005;113(7):823-39.

156. Liu X, Sen S, Liu J, Kulaots I, Geohegan D, Kane A, et al. Antioxidant deactivation on graphenic nanocarbon surfaces. Small Weinh Bergstr Ger. 2011;7(19):2775-85.

157. Chang Y, Yang S-T, Liu J-H, Dong E, Wang Y, Cao A, et al. In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells. Toxicol Lett. 2011;200(3):201-10.

158. Zhang Y, Ali SF, Dervishi E, Xu Y, Li Z, Casciano D, et al. Cytotoxicity effects of graphene and single-wall carbon nanotubes in neural phaeochromocytoma-derived PC12 cells. ACS Nano. 2010;4(6):3181-6.

159. Li Y, Yuan H, Bussche A von dem, Creighton M, Hurt RH, Kane AB, et al. Graphene microsheets enter cells through spontaneous membrane penetration at edge asperities and corner sites. Proc Natl Acad Sci USA. 2013;110(30):12295-300.

160. Dubey N, Bentini R, Islam I, Cao T, Castro Neto AH, Rosa V. Graphene: A Versatile Carbon-Based Material for Bone Tissue Engineering. Stem Cells Int. 2015;2015:804213.

161. Shi X, Chang H, Chen S, Lai C, Khademhosseini A, Wu H. Regulating Cellular Behavior on Few-Layer Reduced Graphene Oxide Films with Well-Controlled Reduction States. Adv Funct Mater. 2012;22(4):751-9.

162. Wang L, Lu C, Zhang B, Zhao B, Wu F, Guan S. Fabrication and characterization of flexible silk fibroin films reinforced with graphene oxide for biomedical applications. RSC Adv. 2014;4(76):40312-20.

163. Ryu S, Kim B-S. Culture of neural cells and stem cells on graphene. Tissue Eng Regen Med. 2013;10(2):39-46.

164. Hong SW, Lee JH, Kang SH, Hwang EY, Hwang Y-S, Lee MH, et al. Enhanced Neural Cell Adhesion and Neurite Outgrowth on Graphene-Based Biomimetic Substrates, Enhanced Neural Cell Adhesion and Neurite Outgrowth on Graphene-Based Biomimetic Substrates. BioMed Res Int BioMed Res Int. 2014;e212149.

165. Kim T-H, Shah S, Yang L, Yin PT, Hossain MK, Conley B, et al. Controlling Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells Using Combinatorial Graphene Hybrid-Pattern Arrays. ACS Nano. 2015;9(4):3780-90.

166. Fernández Merino, María Jesús. Grafenos separados por métodos químicos: características y aplicaciones. [Oviedo]: Universidad de Oviedo; 2013.

167. Donaldson K, Aitken R, Tran L, Stone V, Duffin R, Forrest G, et al. Carbon nanotubes: a review of their properties in relation to pulmonary

toxicology and workplace safety. Toxicol Sci Off J Soc Toxicol. 2006;92(1):5-22.

168. Sanchez VC, Pietruska JR, Miselis NR, Hurt RH, Kane AB. Biopersistence and potential adverse health impacts of fibrous nanomaterials: what have we learned from asbestos? Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2009;1(5):511-29.

169. Liu X, Hurt RH, Kane AB. Biodurability of Single-Walled Carbon Nanotubes Depends on Surface Functionalization. Carbon. 2010;48(7):1961-9.

170. Allen BL, Kichambare PD, Gou P, Vlasova II, Kapralov AA, Konduru N, et al. Biodegradation of single-walled carbon nanotubes through enzymatic catalysis. Nano Lett. 2008;8(11):3899-903.

171. Kagan VE, Konduru NV, Feng W, Allen BL, Conroy J, Volkov Y, et al. Carbon nanotubes degraded by neutrophil myeloperoxidase induce less pulmonary inflammation. Nat Nanotechnol. 2010;5(5):354-9.

172. Kotchey GP, Allen BL, Vedala H, Yanamala N, Kapralov AA, Tyurina YY, et al. The enzymatic oxidation of graphene oxide. ACS Nano. 2011;5(3):2098-108.

173. Depan D, Girase B, Shah JS, Misra RDK. Structure–process–property relationship of the polar graphene oxide-mediated cellular response and stimulated growth of osteoblasts on hybrid chitosan network structure nanocomposite scaffolds. Acta Biomater. 2011;7(9):3432-45.

174. Fan H, Wang L, Zhao K, Li N, Shi Z, Ge Z, et al. Fabrication, Mechanical Properties, and Biocompatibility of Graphene-Reinforced Chitosan Composites. Biomacromolecules. 2010;11(9):2345-51.

175. Ren H, Wang C, Zhang J, Zhou X, Xu D, Zheng J, et al. DNA cleavage system of nanosized graphene oxide sheets and copper ions. ACS Nano. 2010;4(12):7169-74.

176. Lu C-H, Zhu C-L, Li J, Liu J-J, Chen X, Yang H-H. Using graphene to protect DNA from cleavage during cellular delivery. Chem Commun Camb Engl. 2010;46(18):3116-8.

177. Wang Y, Li Z, Hu D, Lin C-T, Li J, Lin Y. Aptamer/graphene oxide nanocomplex for in situ molecular probing in living cells. J Am Chem Soc. 2010;132(27):9274-6.

178. Xu Y, Wu Q, Sun Y, Bai H, Shi G. Three-dimensional self-assembly of graphene oxide and DNA into multifunctional hydrogels. ACS Nano. 2010;4(12):7358-62.

179. Wu M, Kempaiah R, Huang P-JJ, Maheshwari V, Liu J. Adsorption and desorption of DNA on graphene oxide studied by fluorescently labeled oligonucleotides. Langmuir ACS J Surf Colloids. 2011;27(6):2731-8.

180. Titov AV, Král P, Pearson R. Sandwiched graphene--membrane superstructures. ACS Nano. 2010;4(1):229-34.

181. Mu Q, Su G, Li L, Gilbertson BO, Yu LH, Zhang Q, et al. Size-dependent cell uptake of protein-coated graphene oxide nanosheets. ACS Appl Mater Interfaces. 2012;4(4):2259-66.

182. Kim T, Kahng YH, Lee T, Lee K, Kim DH. Graphene films show stable cell attachment and biocompatibility with electrogenic primary cardiac cells. Mol Cells. 2013;36(6):577-82.

183. Kim J, Choi KS, Kim Y, Lim K-T, Seonwoo H, Park Y, et al. Bioactive effects of graphene oxide cell culture substratum on structure and function of human adipose-derived stem cells. J Biomed Mater Res A. 2013;101(12):3520-30.

184. Rodríguez-Lozano FJ, García-Bernal D, Aznar-Cervantes S, Ros-Roca MA, Algueró MC, Atucha NM, et al. Effects of composite films of silk fibroin and graphene oxide on the proliferation, cell viability and mesenchymal phenotype of periodontal ligament stem cells. J Mater Sci Mater Med. 2014;25(12):2731-41.

185. Lu J, He Y-S, Cheng C, Wang Y, Qiu L, Li D, et al. Self-Supporting Graphene Hydrogel Film as an Experimental Platform to Evaluate the Potential of Graphene for Bone Regeneration. Adv Funct Mater. 2013;23(28):3494-502.

186. Li N, Zhang Q, Gao S, Song Q, Huang R, Wang L, et al. Three-dimensional graphene foam as a biocompatible and conductive scaffold for neural stem cells. Sci Rep. 2013;3:1604.

187. Gu M, Liu Y, Chen T, Du F, Zhao X, Xiong C, et al. Is graphene a promising nano-material for promoting surface modification of implants or scaffold materials in bone tissue engineering? Tissue Eng Part B Rev. 2014;20(5):477-91.

188. Guo F, Kim F, Han TH, Shenoy VB, Huang J, Hurt RH. Hydration-Responsive Folding and Unfolding in Graphene Oxide Liquid Crystal Phases. ACS Nano. 2011;5(10):8019-25.

189. Ma X, Tao H, Yang K, Feng L, Cheng L, Shi X, et al. A functionalized graphene oxide-iron oxide nanocomposite for magnetically targeted drug delivery, photothermal therapy, and magnetic resonance imaging. Nano Res. 2012;5(3):199-212.

190. Yang, T., Wan, J., Zhang, S, Zhang, Y., Lee, S-T., Liu, Z. In vivo pharmacokinetics, long-term biodistribution, and toxicology of PEGylated graphene in mice. ACS Nano. 2010;5:516-22.

191. Wen H, Dong C, Dong H, Shen A, Xia W, Cai X, et al. Engineered Redox-Responsive PEG Detachment Mechanism in PEGylated Nano-Graphene Oxide for Intracellular Drug Delivery. Small. 2012;8(5):760-9.

192. Cheng HKF, Sahoo NG, Tan YP, Pan Y, Bao H, Li L, et al. Poly(vinyl alcohol) Nanocomposites Filled with Poly(vinyl alcohol)-Grafted Graphene Oxide. ACS Appl Mater Interfaces. 2012;4(5):2387-94.

193. Chen B, Liu M, Zhang L, Huang J, Yao J, Zhang Z. Polyethylenimine-functionalized graphene oxide as an efficient gene delivery vector. J Mater

Chem. 2011;21(21):7736-41.

194. Depan D, Shah J, Misra RDK. Controlled release of drug from folate-decorated and graphene mediated drug delivery system: Synthesis, loading efficiency, and drug release response. Mater Sci Eng C. 2011;31(7):1305-12.

195. Bao H, Pan Y, Ping Y, Sahoo NG, Wu T, Li L, et al. Chitosan-Functionalized Graphene Oxide as a Nanocarrier for Drug and Gene Delivery. Small. 2011;7(11):1569-78.

196. Zhang L, Wang Z, Xu C, Li Y, Gao J, Wang W, et al. High strength graphene oxide/polyvinyl alcohol composite hydrogels. J Mater Chem. 2011;21(28):10399-406.

197. Lu B, Li T, Zhao H, Li X, Gao C, Zhang S, et al. Graphene-based composite materials beneficial to wound healing. Nanoscale. 2012;4(9):2978-82.

198. Chen G-Y, Pang DW-P, Hwang S-M, Tuan H-Y, Hu Y-C. A graphene-based platform for induced pluripotent stem cells culture and differentiation. Biomaterials. 2012;33(2):418-27.

199. Nayak TR, Andersen H, Makam VS, Khaw C, Bae S, Xu X, et al. Graphene for controlled and accelerated osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. ACS Nano. 2011;5(6):4670-8.

200. Lee WC, Lim CHYX, Shi H, Tang LAL, Wang Y, Lim CT, et al. Origin of Enhanced Stem Cell Growth and Differentiation on Graphene and Graphene Oxide. ACS Nano. 2011;5(9):7334-41.

201. Shin SR, Aghaei-Ghareh-Bolagh B, Dang TT, Topkaya SN, Gao X, Yang SY, et al. Cell-laden microengineered and mechanically tunable hybrid hydrogels of gelatin and graphene oxide. Adv Mater Deerfield Beach Fla. 2013;25(44):6385-91.

202. Stoltz J-F, de Isla N, Li YP, Bensoussan D, Zhang L, Huselstein C, et al. Stem Cells and Regenerative Medicine: Myth or Reality of the 21th Century. Stem Cells Int. 2015;2015:734731.

203. Zhang J, Li L. Stem cell niche: microenvironment and beyond. J Biol Chem. 2008;283(15):9499-503.

204. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. Cell. 2000;100(1):157-68.

205. Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, et al. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. Annu Rev Immunol. 2003;21:759-806.

206. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(25):13625-30.

207. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proc Natl Acad Sci U S A.

2003;100(10):5807-12.

208. Morsczeck C, Moehl C, Götz W, Heredia A, Schäffer TE, Eckstein N, et al. In vitro differentiation of human dental follicle cells with dexamethasone and insulin. Cell Biol Int. 2005;29(7):567-75.

209. Morsczeck C. Gene expression of runx2, Osterix, c-fos, DLX-3, DLX-5, and MSX-2 in dental follicle cells during osteogenic differentiation in vitro. Calcif Tissue Int. 2006;78(2):98-102.

210. Morsczeck C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C, et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol. 2005;24(2):155-65.

211. Morsczeck CO, Drees J, Dress J, Gosau M. Lipopolysaccharide from Escherichia coli but not from Porphyromonas gingivalis induce pro-inflammatory cytokines and alkaline phosphatase in dental follicle cells. Arch Oral Biol. 2012;57(12):1595-601.

212. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo B-M, Zhang C, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. PloS One. 2006;1:e79.

213. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. J Endod. 2008;34(2):166-71.

214. Huang GT-J, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S. The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. J Endod. 2008;34(6):645-51.

215. Seo B-M, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. Lancet Lond Engl. 2004;364(9429):149-55.

216. Gay IC, Chen S, MacDougall M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. Orthod Craniofac Res. 2007;10(3):149-60.

217. Xu J, Wang W, Kapila Y, Lotz J, Kapila S. Multiple differentiation capacity of STRO-1+/CD146+ PDL mesenchymal progenitor cells. Stem Cells Dev. 2009;18(3):487-96.

218. Choi S, Cho T-J, Kwon S-K, Lee G, Cho J. Chondrogenesis of periodontal ligament stem cells by transforming growth factor-β3 and bone morphogenetic protein-6 in a normal healthy impacted third molar. Int J Oral Sci. 2013;5(1):7-13.

219. Park J-C, Kim J-M, Jung I-H, Kim JC, Choi S-H, Cho K-S, et al. Isolation and characterization of human periodontal ligament (PDL) stem cells (PDLSCs) from the inflamed PDL tissue: in vitro and in vivo evaluations. J Clin Periodontol. 2011;38(8):721-31.

220. Chen SC, Marino V, Gronthos S, Bartold PM. Location of putative stem

cells in human periodontal ligament. J Periodontal Res. 2006;41(6):547-53.

221. Widera D, Grimm W-D, Moebius JM, Mikenberg I, Piechaczek C, Gassmann G, et al. Highly Efficient Neural Differentiation of Human Somatic Stem Cells, Isolated by Minimally Invasive Periodontal Surgery. Stem Cells Dev. 2007;16(3):447-60.

222. Ji K, Liu Y, Lu W, Yang F, Yu J, Wang X, et al. Periodontal tissue engineering with stem cells from the periodontal ligament of human retained deciduous teeth. J Periodontal Res. 2013;48(1):105-16.

223. Silvério KG, Rodrigues TL, Coletta RD, Benevides L, Da Silva JS, Casati MZ, et al. Mesenchymal stem cell properties of periodontal ligament cells from deciduous and permanent teeth. J Periodontol. 2010;81(8):1207-15.

224. Fukushima H, Kawanabe N, Murata S, Ishihara Y, Yanagita T, Balam TA, et al. SSEA-4 is a marker of human deciduous periodontal ligament stem cells. J Dent Res. 2012;91(10):955-60.

225. Wang W-J, Zhao Y-M, Lin B-C, Yang J, Ge L-H. Identification of multipotent stem cells from adult dog periodontal ligament. Eur J Oral Sci. 2012;120(4):303-10.

226. Gronthos S, Mrozik K, Shi S, Bartold PM. Ovine Periodontal Ligament Stem Cells: Isolation, Characterization, and Differentiation Potential. Calcif Tissue Int. 2006;79(5):310-7.

227. Shirai K, Ishisaki A, Kaku T, Tamura M, Furuichi Y. Multipotency of clonal cells derived from swine periodontal ligament and differential regulation by fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein. J Periodontal Res. 2009;44(2):238-47.

228. Hidaka T, Nagasawa T, Shirai K, Kado T, Furuichi Y. FGF-2 induces proliferation of human periodontal ligament cells and maintains differentiation potentials of STRO-1+/CD146+ periodontal ligament cells. Arch Oral Biol. 2012;57(6):830-40.

229. Sant'Ana ACP, Marques MM, Barroso TEC, Passanezi E, de Rezende MLR. Effects of TGF-beta1, PDGF-BB, and IGF-1 on the rate of proliferation and adhesion of a periodontal ligament cell lineage in vitro. J Periodontol. 2007;78(10):2007-17.

230. Choi M-H, Noh W-C, Park J-W, Lee J-M, Suh J-Y. Gene expression pattern during osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells in vitro. J Periodontal Implant Sci. 2011;41(4):167-75.

231. Suaid FF, Ribeiro FV, Gomes TRLES, Silvério KG, Carvalho MD, Nociti FH, et al. Autologous periodontal ligament cells in the treatment of class III furcation defects: a study in dogs. J Clin Periodontol. 2012;39(4):377-84.

232. Kim S-H, Kim K-H, Seo B-M, Koo K-T, Kim T-I, Seol Y-J, et al. Alveolar bone regeneration by transplantation of periodontal ligament stem cells and bone marrow stem cells in a canine peri-implant defect model: a pilot study. J Periodontol. 2009;80(11):1815-23.

233. Han J, Menicanin D, Marino V, Ge S, Mrozik K, Gronthos S, et al. Assessment of the regenerative potential of allogeneic periodontal ligament stem cells in a rodent periodontal defect model. J Periodontal Res. 2014;49(3):333-45.

234. Rodríguez-Lozano F-J, Insausti C-L, Iniesta F, Blanquer M, Ramírez M-C, Meseguer L, et al. Mesenchymal dental stem cells in regenerative dentistry. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2012;17(6):e1062-7.

235. Fernandez-Merino MJ, Guardia L, Paredes JI, Villar-Rodil S, Solis-Fernandez P, Martinez-Alonso A, et al. Vitamin C is an ideal substitute for hydrazine in the reduction of graphene oxide suspensions. J Phys Chem C. 2010;114(14):6426-32.

236. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006;8(4):315-7.

237. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2005;7(5):393-5.

238. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods San Diego Calif. 2001;25(4):402-8.

239. Ragni E, Viganò M, Rebulla P, Giordano R, Lazzari L. What is beyond a qRT-PCR study on mesenchymal stem cell differentiation properties: how to choose the most reliable housekeeping genes. J Cell Mol Med. 2013;17(1):168-80.

240. Stein GS, Lian JB, van Wijnen AJ, Stein JL, Montecino M, Javed A, et al. Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. Oncogene. 2004;23(24):4315-29.

241. Akiyama H, Chaboissier M-C, Martin JF, Schedl A, de Crombrugghe B. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. Genes Dev. 2002;16(21):2813-28.

242. Murakami S, Kan M, McKeehan WL, de Crombrugghe B. Up-regulation of the chondrogenic Sox9 gene by fibroblast growth factors is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway. Proc Natl Acad Sci USA. 2000;97(3):1113-8.

243. Gao Y, Jheon A, Nourkeyhani H, Kobayashi H, Ganss B. Molecular cloning, structure, expression, and chromosomal localization of the human Osterix (SP7) gene. Gene. 2004;341:101-10.

244. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. Cell. 2002;108(1):17-29.

245. Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). J Bone Joint Surg Am. 2003;85-A(8):1544-52.

246. Weiss MJ, Ray K, Henthorn PS, Lamb B, Kadesch T, Harris H. Structure of the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene. J Biol Chem. 1988;263(24):12002-10.

247. Wu Z, Wang J, Dong R, Wang L, Fan Z, Liu D, et al. Depletion of MEIS2 inhibits osteogenic differentiation potential of human dental stem cells. Int J Clin Exp Med. 2015;8(5):7220-30.

248. Lazarides E, Lukens LN. Collagen synthesis on polysomes in vivo and in vitro. Nature New Biol. 1971;232(28):37-40.

249. Swaminathan Y, Thomas JT. What makes cementum a unique structure? IJSER. 2013;4(12):2268-86.

250. Jung C, Ou YC, Yeung F, Frierson HF, Kao C. Osteocalcin is incompletely spliced in non-osseous tissues. Gene. 2001;271(2):143-50.

251. Zoch ML, Clemens TL, Riddle RC. New insights into the biology of osteocalcin. Bone. 2015;

252. Ikeda M, Kanao Y, Yamanaka M, Sakuraba H, Mizutani Y, Igarashi Y, et al. Characterization of four mammalian 3-hydroxyacyl-CoA dehydratases involved in very long-chain fatty acid synthesis. FEBS Lett. 2008;582(16):2435-40.

253. Torii D, Konishi K, Watanabe N, Goto S, Tsutsui T. Cementogenic potential of multipotential mesenchymal stem cells purified from the human periodontal ligament. Odontol Soc Nippon Dent Univ. 2015;103(1):27-35.

254. Komaki M, Iwasaki K, Arzate H, Narayanan AS, Izumi Y, Morita I. Cementum protein 1 (CEMP1) induces a cementoblastic phenotype and reduces osteoblastic differentiation in periodontal ligament cells. J Cell Physiol. 2012;227(2):649-57.

255. Alvarez-Pérez MA, Narayanan S, Zeichner-David M, Rodríguez Carmona B, Arzate H. Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23). Bone. 2006;38(3):409-19.

256. Hu K, Gupta MK, Kulkarni DD, Tsukruk VV. Ultra-robust graphene oxide-silk fibroin nanocomposite membranes. Adv Mater Deerfield Beach Fla. 2013;25(16):2301-7.

257. Dulgar-Tulloch AJ, Bizios R, Siegel RW. Human mesenchymal stem cell adhesion and proliferation in response to ceramic chemistry and nanoscale topography. J Biomed Mater Res A. 2009;90A(2):586-94.

258. Oh S, Brammer KS, Li YSJ, Teng D, Engler AJ, Chien S, et al. Stem cell fate dictated solely by altered nanotube dimension. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(7):2130-5.

259. McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K, Chen CS. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. Dev Cell. 2004;6(4):483-95.

260. Li X, Cai W, An J, Kim S, Nah J, Yang D, et al. Large-area synthesis of high-quality and uniform graphene films on copper foils. Science. 2009;324(5932):1312-4.

261. Yim EKF, Darling EM, Kulangara K, Guilak F, Leong KW. Nanotopography-induced changes in focal adhesions, cytoskeletal organization, and mechanical properties of human mesenchymal stem cells. Biomaterials. 2010;31(6):1299.

262. Park JS, Chu JS, Tsou AD, Diop R, Tang Z, Wang A, et al. The effect of matrix stiffness on the differentiation of mesenchymal stem cells in response to TGF-β. Biomaterials. 2011;32(16):3921-30.

263. Zhang Y, Li S, Wu C. The in vitro and in vivo cementogenesis of $CaMgSi_2O_6$ bioceramic scaffolds. J Biomed Mater Res A. 2014;102(1):105-16.

264. Zhou Y, Wu C, Xiao Y. The stimulation of proliferation and differentiation of periodontal ligament cells by the ionic products from Ca7Si2P2O16 bioceramics. Acta Biomater. 2012;8(6):2307-16.

265. Yan-Zhi X, Jing-Jing W, Chen Y-P, Liu J, Li N, Yang F-Y. The use of zein and Shuanghuangbu for periodontal tissue engineering. Int J Oral Sci. 2010;2(3):142-8.

266. Mei F, Zhong J, Yang X, Ouyang X, Zhang S, Hu X, et al. Improved biological characteristics of poly(L-lactic acid) electrospun membrane by incorporation of multiwalled carbon nanotubes/hydroxyapatite nanoparticles. Biomacromolecules. 2007;8(12):3729-35.

267. Ge S, Zhao N, Wang L, Yu M, Liu H, Song A, et al. Bone repair by periodontal ligament stem cellseeded nanohydroxyapatite-chitosan scaffold. Int J Nanomedicine. 2012;7:5405-14.

268. Ning L, Malmström H, Ren Y-F. Porous collagen-hydroxyapatite scaffolds with mesenchymal stem cells for bone regeneration. J Oral Implantol. 2015;41(1):45-9.

269. Leal AI, Caridade SG, Ma J, Yu N, Gomes ME, Reis RL, et al. Asymmetric PDLLA membranes containing Bioglass® for guided tissue regeneration: characterization and in vitro biological behavior. Dent Mater Off Publ Acad Dent Mater. 2013;29(4):427-36.

270. Heo Y-Y, Um S, Kim S-K, Park J-M, Seo BM. Responses of periodontal ligament stem cells on various titanium surfaces. Oral Dis. abril de 2011;17(3):320-7.

271. Han Xiea, Tong Caoa, José Viana Gomesb, Antônio Hélio Castro Netob, Vinicius Rosa. Two and three-dimensional graphene substrates to magnify osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells. Carbon.

2015;93:266-75.

272. Lee JH, Shin YC, Jin OS, Kang SH, Hwang Y-S, Park J-C, et al. Reduced graphene oxide-coated hydroxyapatite composites stimulate spontaneous osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. Nanoscale. 2015;7(27):11642-51.

273. Chen XD, Qian HY, Neff L, Satomura K, Horowitz MC. Thy-1 antigen expression by cells in the osteoblast lineage. J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res. 1999;14(3):362-75.

274. Jin HJ, Park SK, Oh W, Yang YS, Kim SW, Choi SJ. Down-regulation of CD105 is associated with multi-lineage differentiation in human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. Biochem Biophys Res Commun. 2009;381(4):676-81.

275. Wiesmann A, Bühring H-J, Mentrup C, Wiesmann H-P. Decreased CD90 expression in human mesenchymal stem cells by applying mechanical stimulation. Head Face Med. 2006;2:8.

276. Akhavan O, Ghaderi E, Abouei E, Hatamie S, Ghasemi E. Accelerated differentiation of neural stem cells into neurons on ginseng-reduced graphene oxide sheets. Carbon. 2014;66:395-406.

277. Park SY, Park J, Sim SH, Sung MG, Kim KS, Hong BH, et al. Enhanced differentiation of human neural stem cells into neurons on graphene. Adv Mater Deerfield Beach Fla. 2011;23(36):H263-7.

278. Bosshardt DD, Selvig KA. Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. Periodontol 2000. febrero de 1997;13:41-75.

279. Gonçalves PF, Sallum EAS, Sallum AW, Casati MZC, Toledo S de T, Junior N, et al. Dental cementum reviewed: development, structure, composition, regeneration and potential functions. Braz J Oral Sci. 2005;4(12):651-8.

280. Kim B-C, Bae H, Kwon I-K, Lee E-J, Park J-H, Khademhosseini A, et al. Osteoblastic/cementoblastic and neural differentiation of dental stem cells and their applications to tissue engineering and regenerative medicine. Tissue Eng Part B Rev. 2012;18(3):235-44.

281. Torii D, Tsutsui TW, Watanabe N, Konishi K. Bone morphogenetic protein 7 induces cementogenic differentiation of human periodontal ligament-derived mesenchymal stem cells. Odontol Soc Nippon Dent Univ. 2014;

282. Ozeki N, Mogi M, Kawai R, Yamaguchi H, Hiyama T, Nakata K, et al. Mouse-induced pluripotent stem cells differentiate into odontoblast-like cells with induction of altered adhesive and migratory phenotype of integrin. PloS One. 2013;8(11):e80026.

283. Miyaji H, Sugaya T, Kato K, Kawamura N, Tsuji H, Kawanami M. Dentin resorption and cementum-like tissue formation by bone morphogenetic protein application. J Periodontal Res. 2006;41(4):311-5.

284. Kapinas K, Grandy R, Ghule P, Medina R, Becker K, Pardee A, et al. The abbreviated pluripotent cell cycle. J Cell Physiol. 2013;228(1):9-20.

285. Dalby MJ, Gadegaard N, Tare R, Andar A, Riehle MO, Herzyk P, et al. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. Nat Mater. 2007;6(12):997-1003.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

7-ADD: 7-aminoactinomicina

cDNA: ADN copia

CVD: deposción química de vapor

DFSCs: células madre del folículo dental

DPSCs: células madre de la pulpa dental

GO: óxido de grafeno

HA: hidroxiapatita

HFIP: hexafluoroisopropanol

hMSC: células madre mesenquimales humanas

hPDL: ligamento periodontal humano

hPDLSCs: células madre humanas de ligamento periodontal

hTMKs: queratinocitos humanos de la membrana timpánica

OECs: células envolventes olfativas

PDL: ligamento periodontal

PDLSCs: células madre de ligamento periodontal

PE: ficoeritrina

PEG: polietilenglicol

PEI: polietilenimina

PLA: ácido poliláctico

PVA: ácido polovinílico

rGO: óxido de grafeno reducido

rSF: fibroína de seda tratada con ácido ascórbico

SF: fibroína de seda

TGF: factor de crecimiento transcripcional

TNF: factor de necrosis tumoral

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Áreas de investigación en medicina regenerativa (modificado de Dieckmann y col. (2)). *Pág. 3*

Figura 2. Representación esquemática de la obtención e implante de células especializadas de la cavidad oral, a partir de células madre cultivadas sobre biomateriales para la regeneración de tejidos periodontales (E: esmalte, D: dentina, P: pulpa, G: tejido gingival, PL: ligamento periodontal, AB: hueso alveolar, NPL: nuevo ligamento periodontal, NB: hueso nuevo, NC: cemento nuevo) (modificado de Neel 2014 (14)). *Pág. 6*

Figura 3. Capullo de *Bombix mori* (izquierda). Disposición de las proteínas fibroína y sericina en las fibras producidas por *B. Mori* (derecha). *Pág. 7*

Figura 4. a. Esquema ilustrado de la organización molecular de la fibroina (25). b. Esquema ilustrado de los procesos de nucleación y agregación de la fibroína. *Pág. 8*

Figura 5. Estructura en lámina-β de la SF (a). Repeticiones Gly-Ala (b)(29). *Pág. 10*

Figura 6. Glándula sericígena e hilado de *Bombyx mori* (31). *Pág. 11*

Fig. 7. Presentaciones de la SF como biomaterial (tomado de Rockwood, 2011 (55)). *Pág. 19*

Figura 8. Figura ilustrativa del proceso de electrohilado y vista macroscópica de la malla de nanofibras generada (tomado de Rockwood, 2011 (55)). *Pág. 18*

Figura 9. Hidrogel de SF acuosa al 1.5%. *Pág. 20*

Figura 10. Ultraestructura de esponjas porosas de fibroína sembradas con células madre mesenquimales de médula ósea. Fotografía obtenida durante un experimento piloto realizado en el IMIDA (Murcia)(30). *Pág. 21*

Figura 11. *Film* de SF, moldeado en la superficie de una placa de Petri, que pone de manifiesto la transparencia del mismo (tomado de Aznar 2013 (30)). *Pág. 23*

Figura 12. Formas alotrópicas del carbono: diamante y grafito (3D) grafeno (2D), nanotubos y fulleneros (0D) (tomado de Rodríguez-González 2008 (144)). *Pág. 34*

Figura 13. Etapas en la obtención de GO (tomado de García 2013 (142)). *Pág. 35*

Figura 14. Modelos propuestos para la estructura del GO: Hofmann, Ruess, Scholz-Boehm, Nakajima-Matsuo, Lerf-Klinowski, Dékány y Ajayan (modelo actual)(tomado de Chua 2013 (149). *Pág. 36*

Figura 15. a. Modelo estructural de grafeno, GO y rGO. b. Imágenes de la estructura atómica del grafeno, GO y rGO obtenidas por microscopio electrónico de transmisión de resolución ultraalta. Las áreas verdes, moradas y azules representan dominios sp^2, dominios desordenados (sp^3) y vacantes atómicas en las láminas respectivamente (modificado de García 2013 (142)). *Pág. 37*

Figura 16. Clasificación de las células madre. *Pág. 50*

Figura 17. Fuentes de células madre dentales (tomado de Bossú 2014 (10)). SHED: *stem cells from human exfoliated deciduous teeth* (células madre procedentes de dientes decíduos exfoliados humanos); DPSCs: *dental pulp stem cells* (células madre de la pulpa dental); DFSCs: *dental follicle progenitor stem cells* (células madre progenitoras del folículo dental); SCAP: *stem cells from apical papilla* (células madre de la papila apical); PDLSCs: *periodontal ligament stem cells* (células madre de ligamento periodontal). *Pág. 51*

Figura 18. Aspecto de las placas oxidada (A) y reducida (B) y esquema ilustrativo en el que se identifica el orden de los *films*. *Pág. 72*

Figura 19. Materiales utilizados en la etapa de recubrimiento con oro. *Pág. 70*

Figura 20. Cultivo celular de hPDLSCs. Micrografías obtenidas con microscopio óptico de campo claro. Aspecto de las células tras 2 (A), 4 (B) y 7 días (C) de cultivo. Subcultivo en pase 3 (D). Escala de la barra: 100 µm. *Pág. 89*

Figura 21. Micrografías a diferentes aumentos de los materiales elaborados con SF y GO puros e independientemente, antes y después del tratamiento con ácido ascórbico (rSF y rGO). *Pág. 92*

Figura 22. Micrografías a diferentes aumentos de los biomateriales elaborados mezclando SF y GO en distintas proporciones. Nótese cómo aumentan las irregularidades de la superficie del *film* conforme se incrementa el contenido en fibroína. *Pág. 93*

Figura 23. Micrografías a diferentes aumentos de los biomateriales dispuestos en bicapa. En el máximo aumento destaca el aspecto tridimensional de los *films* en los que el grafeno se sitúa en la parte superior de la bicapa. *Pág. 95*

Figura 24. Morfología adoptada por las hPDLSCs sobre cada biomaterial tras 10 días en cultivo. Las configuraciones señaladas con un asterisco muestran células sin morfología fusiforme. Nótese la monocapa en la que se disponen las hPDLSCs en las proporciones 1:3. *Pág. 99*

Figura 25. Tasa de proliferación de hPDLSCs tras 4, 7 y 10 días en cultivo sobre los distintos biomateriales estudiados. Los diamantes y estrellas señalan los *films* con la proliferación más alta de forma significativa ($p<0,05$), a 7 y 10 días respectivamente, respecto al resto de biomateriales. Los datos se presentan como valores medios de densidad óptica (DO) medida a 570 nm (n=5). *Pág. 102*

Figura 26. Proliferación de hPDLSCs 7 días después de la siembra. La cruz indica la proliferación más alta con significación estadística ($p<0,05$). El círculo indica que no existen diferencias significativas de absorbancia entre las distintas versiones del mismo *film* pero sí una proliferación mayor que en los biomateriales sin símbolo ($p<0,05$). Los datos se presentan como valores medios de densidad óptica medida a 570 nm (n=5). *Pág. 103*

Figura 27. Proliferación de hPDLSCs 10 días después de la siembra. El asterisco indica una proliferación significativamente más alta ($p<0,05$) entre la version oxidada y reducida del mismo *film*. El diamante indica una proliferación significativamente más baja que el resto de configuraciones. Los datos se presentan como valores medios de densidad óptica medida a 570 nm (n=5). *Pág. 104*

Figura 28. Viabilidad de hPDLSCs tras 10 días en cultivo sobre distintos *films* compuestos por GO y SF (A) y su versión reducida (B). Nótese cómo en todos los *films* la viabilidad de las hPDLSCs supera el 95%. *Pág. 108*

Figura 29. Expresión de marcadores de superficie de células madre mesenquimales (CD73, CD90 y CD105) en hPDLSCs cultivadas sobre distintos *films* compuestos por GO y SF (A) y su versión reducida (B). Se aprecia un fenotipo claramente mesenquimal con valores muy bajos de marcadores hematopoyéticos (CD14, CD20, CD34 y CD45). *Pág. 110*

Figura 30. Perfil osteoblástico de expresión génica mostrado por las hPDLSCs cultivadas durante 10 días sobre plástico en medio de diferenciación osteogénico, Osteodiff®. El análisis de los marcadores fenotípicos de osteoblastos, condroblastos y cementoblastos se realizó mediante PCR cuantitativa. *Pág. 112*

Figura 31. Diferenciación funcional mediante mineralización de las hPDLSCs. A través del microscopio óptico de campo claro se observaron depósitos oscuros (flecha roja) tras 8-10 días de cultivo en medio Osteodiff® (imagen inferior derecha)(aumentos: 4X). *Pág. 113*

Figura 32. Expresión relativa de RUNX2, SOX9 y SP7/OSX tras 10 días en cultivo sobre los distintos *films* en su versión oxidada (cajas blancas) y reducida (cajas grises). *Pág. 117*

Figura 33. Expresión relativa de BMP-2, ALP, COL1A1 y BGLAP tras 10 días en cultivo sobre distintos los distintos *films* en su versión oxidada (cajas blancas) y reducida (cajas grises). *Pág. 120*

Figura 34. Expresión relativa de PTPLA/CAP y CEMP1 tras 10 días en cultivo sobre distintos los distintos *films* en su versión oxidada (cajas blancas) y reducida (cajas grises). *Pág. 122*

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de las fibras de seda en *B. mori* (Modificado de Cao y Wang (28)). *Pág. 10*

Tabla 2. Disposición de los *films* en la placa oxidada. *Pág. 70*

Tabla 3. Disposición de los *films* en la placa reducida. *Pág. 70*

Tabla 4. Mezcla de reactivos para un volumen de reacción. *Pág. 80*

Tabla 5. Mezcla de reactivos para un volumen de reacción. *Pág. 81*